

**Identifikation von Zelloberflächenproteinen zur Beschreibung der Hierarchie
endothelialer Vorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Liska Delia Horsch

aus Solingen

Juli 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf begonnen und in dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen fortgeführt und beendet.

1. Gutachter: PD. Dr. Bernd Giebel

2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Somatische Stamm- und Vorläuferzellen	1
1.2	Hierarchie somatischer Stamm- und Vorläuferzellen am Beispiel der Hämatopoese	1
1.3	Tumorstammzellen.....	4
1.4	Mechanismen Selbsterneuerung <i>versus</i> Differenzierung	6
1.4.1	Der Notch-Signalweg in Drosophila.....	8
1.4.2	Notch1	9
1.4.2.1	Realisatorgene von Notch1	9
1.4.2.2	Liganden von Notch1.....	10
1.4.2.3	Der kanonische Notch-Signalweg im Säugersystem.....	11
1.4.3	Numb als Modulator von Notch.....	12
1.5	Endotheliale Vorläuferzellen	15
1.5.1	Endotheliale- und Endothel-ähnliche Vorläuferzellen	15
1.5.2	<i>In vitro</i> weisen ECFCs/HUVECs eine hierarchische Entwicklung auf	18
1.6	Fragestellung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Materialien und Geräte	20
2.1.1	Übersicht über die verwendeten Kits und Assays	20
2.1.2	Übersicht über die verwendeten Medien/Medienzusätze	20
2.1.3	Antikörper und Seren	21
2.1.3.1	Übersicht über die verwendeten konjugierten Antikörper.....	21
2.1.3.2	Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper und Seren.....	22
2.1.4	Übersicht über die verwendeten Geräte und der dazugehörigen Software ..	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1.1	Verwendete Plasmide zur Herstellung virushaltiger Überstände	23
2.2.1.2	Arbeiten mit RNA und DNA	28
2.2.1.2.1	Extraktion von Gesamt-RNA.....	28
2.2.1.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	29
2.2.1.2.3	Reverse Transkription-Reaktion zur Synthese von cDNA (RT)	29
2.2.1.2.4	TaqMan qRT-PCR.....	30

2.2.2	Zellbiologische Methoden	33
2.2.2.1	Zellkulturmedien	33
2.2.2.2	Plastikware	34
2.2.2.3	Extrazelluläre Matrixkomponenten (EZM)	34
2.2.2.4	Kultivierung von Zellen	34
2.2.2.4.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.2.2.5	HEK293T-Zellen	35
2.2.2.6	Primäre endotheliale Vorläuferzellen	36
2.2.2.6.1	Gewinnung von humanen endothelialen koloniebildenden Vorläuferzellen aus Nabelschnurrestblut	36
2.2.2.6.2	Gewinnung von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen	36
2.2.3	Durchflusszytometrie	37
2.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	37
2.2.3.2	Durchflusszytometrische Isolation von endothelialen Vorläuferzellen	39
2.2.4	Herstellung virushaltiger Überstände	41
2.2.5	Transduktion endothelialer Vorläuferzellen durch lentivirale Vektoren	42
2.2.6	Funktionelle Analysen von endothelialen Vorläuferzellen	42
2.2.6.1	Aufnahme von AcLDL	43
2.2.6.2	Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel	43
2.2.6.3	Analysen zur Migration endothelialer Vorläuferzellen	44
2.2.6.4	Koloniebildungspotential endothelialer Vorläuferzellen	44
2.2.6.5	Kumulative Verdopplungsrate endothelialer Vorläuferzellen	45
2.2.6.6	Nachweis apoptotischer endothelialer Vorläuferzellen	45
2.2.6.7	Nachweis der metabolischen Aktivität von endothelialen Vorläuferzellen	46
2.2.6.8	Aktivierung von endothelialen Vorläuferzellen	46
2.2.7	Immunhistochemische Analysen	47
2.2.7.1	Extrazelluläre Markierung mit fluorochrommarkierten Antikörpern	47
2.2.7.2	Intrazelluläre Markierung mit unkonjugierten Antikörpern	47
2.2.8	Zellkernfärbungen	50
2.2.8.1	Kernfärbung an fixierten Zellen	50
2.2.8.2	Kernfärbung an lebenden Zellen	50
2.2.9	Statistische Analysen	51

3.	Ergebnisse	52
3.1	Anzucht von endothelialen koloniebildenden Vorläuferzellen.....	52
3.2	Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen	54
3.2.1	Proliferationsverlauf von endothelialen Vorläuferzellen <i>in vitro</i>	56
3.3	Endotheliale Vorläuferzellen weisen eine Hierarchie unterschiedlicher Progenitorzellen auf	57
3.3.1	Aktivierung endothelialer Vorläuferzellen als möglicher Grund für eine heterogene Expression von Oberflächenproteinen	63
3.3.1.1	Vergleich der Expression der übrigen Kandidaten nach Aktivierung	68
3.4	Hierarchische Auftrennung endothelialer Vorläuferzellen durch die Oberflächenantigene CD44 und CD34	71
3.4.1	Anreicherung mehrkerniger endothelialer Vorläuferzellen.....	74
3.4.1.1	Durchflusszytometrische Darstellung mehrkerniger ECFCs	74
3.4.1.2	Durchflusszytometrische Anreicherung mehrkerniger ECFCs.....	76
3.4.2	Einzelzellablagen	77
3.5	Verbesserung der Kulturbedingungen für die klonale Expansion von ECFCs .	79
3.5.1	Analyse verschiedener Matrices zur Kultivierung von endothelialen Vorläuferzellen	79
3.5.2	Effekt von Medien auf die Expansion von ECFCs	82
3.5.3	Vergleich der funktionellen Eigenschaften von ECFCs kultiviert unter den Standard- und optimierten Bedingungen	86
3.6	Analyse der Hierarchie von ECFCs unter optimierten Kulturbedingungen	89
3.6.1	Bestimmung des koloniebildenden Potentials durch Einzelzellablagen	89
3.6.2	Bestimmung des Angiogenesepotentials von CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻ , CD44 ⁺ CD34 ⁻ und CD44 ⁺ CD34 ⁺ ECFC Subpopulationen <i>in vitro</i>	93
3.6.3	Migrationspotential.....	97
3.6.4	Kryoschnitte humaner Nabelschnurvenen für <i>in situ</i> Analysen	97
3.7	Genetische Manipulation endothelialer Vorläuferzellen	99
3.7.1	Einfluss von Nb1-4, NbL, dnMAML1, NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 auf das Proliferationsverhalten genetisch manipulierter HUVECs	100
3.7.1.1	Untersuchung des Effekts der genetischen Veränderung auf die Wachstumskinetik	106
3.7.1.2	Koloniebildungspotential lentiviral transduzierter HUVECs.....	110
3.7.1.3	Beeinflussung der Hierarchie	114
3.7.2	Interaktion von Numb und Notch	119

3.8	Nachweis des Angiogenesepotentials <i>in vitro</i> mittels Matrigel.....	123
4.	Diskussion	130
4.1	Hierarchische Entwicklung endothelialer Vorläuferzellen	130
4.1.1	Anwendung einer antikörperbasierenden Strategie zur Beschreibung der Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen	131
4.1.2	Beschreibung der hierarchischen Entwicklung von ECFCs mit Hilfe von CD34 und CD44	132
4.1.3	CD34 und CD44 als Stammzellsurrogatmarker in anderen Zellsystemen.....	136
4.1.4	Hierarchie <i>versus</i> Seneszenz	137
4.2	Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen	137
4.2.1	Einfluss des Notch-Signalwegs auf das angiogene Potential endothelialer Vorläuferzellen	141
4.3	Anzucht von ECFCs	143
5.	Zusammenfassung	145
6.	Summary	147
7.	Anhang	149
7.1	Eidesstattliche Erklärungen	150
7.2	Lebenslauf	151
8.	Danksagung	153
9.	Literaturverzeichnis	155

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BFU-E	<i>Burst Forming Units-Erythroid</i> (Zelle, welche "explosionsartig" erythroide Kolonien bildet)
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Koloniebildende Einheit)
CFU-EC	<i>Colony Forming Unit- endothelial cells</i> (Endotheliale koloniebildende Zelle)
CFU-G	<i>Colony Forming Unit-Granulocyte</i> (Granulozytäre koloniebildende Zelle)
CFU-GEMM	<i>Colony Forming Unit-Granulocyte Erthroid Macrophage Megakaryocyte</i> (Granulozytäre, erythroide, makrozytäre und megakaryozytäre koloniebildende Zelle)
CFU-M	<i>Colony Forming Unit-Macrophage</i> (Makrozytäre koloniebildende Zelle)
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i> (Vorläuferzelle der lymphatischen Linie)
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i> (Vorläuferzelle der myeloischen Linie)
DIL	1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine
DMEM	Dulbeco's modifiziertes essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ECD	<i>Energy coupled dye</i>
ECFC	<i>endothelial colony forming cell</i> (Endotheliale koloniebildende Zelle)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Fötales Rinderserum)

FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
HA	Hyaluronsäure
HPP-ECFC	<i>high proliferative potential-ECFC</i> (ECFC mit stark proliferierendem Potential)
HPZ	Hämatopoetische Progenitorzelle
HS	Hitzeschock
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i> (Humane umbilikale Venenendothelzelle)
HVZ	Hämatopoetische Vorläuferzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPP-ECFC	<i>low proliferative potential-ECFC</i> (ECFC mit geringem proliferierendem Potential)
LPS	Lipopolysaccharid
LTC-IC	<i>Long Term Culture-Initiating Cell</i> (Nachweis früher myeloischer Progenitoren nach Langzeitkultivierung)
M	Molar
ML-IC	<i>Myeloid Lymphoid-Initiating Cell</i> (Myeloide und lymphatische Progenitorhervorbringende Zelle)
MNZ	Mononukleäre Zelle(n)
NK	Natürliche Killerzelle(n)
NK-IC	<i>Natural Killer cells-Initiating Cell</i> (Zelle, welche funktionelle NK hervorbringt)
NOD-SCID	<i>Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency</i> (Nicht fettleibiger diabetischer-schwerer kombinierter Immundefekt)
P	Passage
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (Blutplättchen Wachstumsfaktor)

PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PL	Plättchenlysat
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	<i>Real time quantitative-Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion)
SOP	<i>Sensory Organ Precursor</i> (sensorische Organvorläuferzelle)
SSC	<i>side scatter</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
tRFP	<i>turbo Red Fluorescent Protein</i>
TSZ	Tumorstammzelle
U	Unit
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin I
ÜN	über Nacht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vWF	von Willebrand Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 :	Hierarchische Entwicklung des humanen hämatopoetischen Systems.....	2
Abb. 2 :	Modell zur hierarchischen Entwicklung hämatopoetischer Zellen.....	4
Abb. 3 :	Kanonische Notch-Signalweg.....	12
Abb. 4 :	In Säugern existieren vier Numb-Isoformen.....	13
Abb. 5 :	Modell des Entwicklungsverlaufs somatischer HSZ und ESZ.....	18
Abb. 6 :	Karten der verwendeten Plasmide.....	25
Abb. 7 :	pTRIPZ-shRNAmir Vektor der Firma Open Biosystems.....	28
Abb. 8 :	Morphologie von ECFCs und HUVECs in vitro.....	53
Abb. 9 :	Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen.....	55
Abb. 10 :	Zellverdoppelungen unterschiedlicher ECFC-Linien in vitro.....	57
Abb. 11 :	Expressionsmuster.....	59
Abb. 12 :	Expressionsmuster der Oberflächenantigene aus Gruppe 1 dargestellt an drei unabhängigen ECFC-Populationen.....	60
Abb. 13 :	Expressionsmuster der Oberflächenantigene aus Gruppe 2.....	60
Abb. 14 :	Vergleich der CD34 und CD44 Oberflächenexpression von unabhängig angezogenen ECFC-Linien.....	62
Abb. 15 :	Entwicklung der drei Subpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ in vitro.....	63
Abb. 16 :	Vergleich der Oberflächenexpression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 unbehandelter und stimulierter ECFCs.....	66
Abb. 17 :	Expression von CD34 und CD44 auf unbehandelten und inflammatorisch stimulierten ECFCs.....	68
Abb. 18 :	Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe 1 nach Aktivierung mit $TNF-\alpha$	69
Abb. 19 :	Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe 2 nach Aktivierung mit $TNF-\alpha$	70
Abb. 20 :	Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD44 auf ECFCs.....	71
Abb. 21 :	Oberflächenexpression von CD34 und CD44 auf der Nachkommenschaft separierter $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen.....	73
Abb. 22 :	Verteilung mehrkerniger ECFCs in den drei Subpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$	74
Abb. 23 :	Propidiumiodid basierte Zellkernanalyse von ECFCs.....	75
Abb. 24 :	Färbungen mit den Kernfarbstoffen Vybrant Dye-ruby, Syto Blue und Hoechst 33324.....	76
Abb. 25 :	Relative Kolonienanzahl einzeln abgelegter ECFCs an Tag 7.....	78
Abb. 26 :	Quantifizierung von ECFCs nach Kultivierung auf unterschiedlichen Matrices.....	81
Abb. 27 :	Metabolische Aktivität von ECFCs nach Kultivierung auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix.....	82
Abb. 28 :	Einfluss von PL auf die Apoptoserate, die metabolische Aktivität und das Koloniebildungspotential von ECFCs.....	85
Abb. 29 :	Vergleich der charakteristischen Eigenschaften von ECFCs kultiviert auf optimierten- und Standardkulturbedingungen.....	88
Abb. 30 :	Relative Anzahl gebildeter Kolonien nach Einzelzellablage.....	91
Abb. 31 :	Verteilung der Koloniegrößen an Tag 14 nach Einzelzellablage.....	92

Abb. 32 :	Erläuterung der Begriffe Verzweigungspunkt, Schlaufe und tubulärartige Struktur sowie der Länge einer tubulären Struktur anhand eines Beispiel.	93
Abb. 33 :	Bildung tubulärartiger Strukturen im vollwertigen-Matrigel.....	95
Abb. 34 :	Bildung tubulärartiger Strukturen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion und $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel.	96
Abb. 35 :	Migrationsgeschwindigkeit der Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion im Vergleich zu den Zellen der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion.	97
Abb. 36 :	In situ Expression von CD34 und CD44 auf HUVECs.	98
Abb. 37 :	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Transduktionseffizienz.	100
Abb. 38:	Strategie zur durchflusszytometrischen Zellseparation von eGFP-exprimierenden HUVECs.....	101
Abb. 39:	Herunterregulation der Expression von Nb und NbL.....	104
Abb. 40:	Anzahl der durchschnittlichen Teilungen genetisch manipulierter HUVECs.	106
Abb. 41:	Wachstumskinetik genetisch manipulierter HUVECs.	109
Abb. 42 :	Relative Anzahl an Kolonien an Tag 14 nach Einzelzellablage.	111
Abb. 43 :	Relative Koloniegröße lentiviral transduzierter HUVECs.	113
Abb. 44 :	Strategie zur Auswertung des Gehalts an $CD34^{+}$ und $CD44^{++}$ Zellen innerhalb der $eGFP^{+}$ und $eGFP^{-}$ Zellfraktion.	115
Abb. 45:	Anteil der $CD44^{++}$ und $CD34$ exprimierenden Zellen.....	118
Abb. 46:	Darstellung der relativen RNA-Expression normalisiert auf die Kontrollzellen.	122
Abb. 47 :	Regulierung der Tip-/Stalk-Zell Spezifizierung durch den Notch-Signalweg.....	124
Abb. 48 :	Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel.	125
Abb. 49:	Bildung tubulärartiger Verzweigungen in vitro.....	127
Abb. 50 :	Identifikation weiterer Marker zur Diskriminierung der beiden Subpopulationen innerhalb der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion.....	135

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Vergleich von zEVZ, ECFCs und HUVECs.....	17
Tab. 2 :	Auflistung der verwendeten Taq-Man Sonden der Firma Applied Biosystems.....	31
Tab. 3 :	Übersicht der verwendeten Laser, PMTs und Bandpassfilter des Cytomics FC 500..	38
Tab. 4 :	Übersicht der verwendeten Laser, PMTs und Filter des Aria I	40
Tab. 5 :	Verwendete Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers Aria I.....	40
Tab. 6 :	Für immunhistochemische Färbungen verwendete Antikörper und Seren	49
Tab. 7 :	Übersicht der Expressionsstärke der 107 getesteten Oberflächenantigene auf ECFCs.....	60
Tab. 8 :	Übersicht der Expression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 auf ECFCs nach Aktivierung.	67
Tab. 9 :	Relatives Koloniebildungspotential einzeln abgelegter ECFCs (%).	78
Tab. 10 :	Koloniegrößen der von ECFCs gebildeten Kolonien unter Standard- und optimierten Bedingungen an Tag 7 nach Einzelzellablage.	86
Tab. 11:	Relatives Koloniebildungspotential von ECFCs an Tag 3, 7 und 14 nach Einzelzellablage (%).	90
Tab. 12 :	Verteilung der Koloniegrößen an Tag 14 nach Einzelzellablage.	92
Tab. 13 :	Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen pro Bildausschnitt.....	94
Tab. 14 :	Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkte, Schlaufen sowie die Länge der gebildeten tubulärartigen Strukturen (µm) im Mittel im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel.	96
Tab. 15 :	Transduktionseffizienzen.....	100
Tab. 16 :	Anzahl der durchschnittlichen Teilungen nach Überexpression potentieller Mediatoren des Notch-Signalwegs.	102
Tab. 17:	Transduktionseffizienzen.....	104
Tab. 18:	Anzahl der durchschnittlichen Teilungen nach Herunterregulation von Nb und NbL.	105
Tab. 19 :	Anteil genetisch manipulierter Zellen in einem Zeitraum von 4 bzw. 8 Passagen. .	108
Tab. 20 :	Prozentualer Anteil an gebildeten Kolonien genetisch manipulierter HUVECs nach Einzelzellablage an Tag 14.....	110
Tab. 21:	Verteilung der Koloniengröße genetisch manipulierter HUVECs.	114
Tab. 22 :	Vergleich des Anteils [%] an CD44 ⁺⁺ Zellen innerhalb der eGFP ⁻ und eGFP ⁺ Zellfraktion.....	116
Tab. 23:	Vergleich des Anteils an CD34 ⁺ Zellen [%] innerhalb der eGFP ⁻ und eGFP ⁺ Zellfraktion.....	117
Tab. 24:	Relative Expression der RNA normalisiert auf die Kontrollzellen.	121
Tab. 25:	Matrigel.....	128

1. Einleitung

1.1 Somatische Stamm- und Vorläuferzellen

Im Laufe des gesamten Lebens gehen in multizellulären Organismen aufgrund von traumatischen, krankheits- oder alterungsbedingten Ereignissen Zellen wie Blut-, Haar- und Hautzellen verloren. Zur Aufrechterhaltung des Organismus müssen solche Zellen neu gebildet werden. Verantwortlich für diese Erneuerung sind sogenannte somatische Stammzellen. Somatische Stammzellen sind undifferenzierte Zellen im Organismus, die sich sowohl über einen längeren Zeitraum hinweg selbst erneuern als auch zu differenzierten Zelltypen entwickeln können. Das Differenzierungspotential von somatischen Stammzellen ist in der Regel auf bestimmte Zelltypen beschränkt. Beispielsweise bringen intestinale Stammzellen die Darmepithelzellen hervor (Potten and Loeffler, 1990) oder hämatopoetische Stammzellen die reifen Blutzellen (Blank et al., 2008; Giebel and Punzel, 2008). Ein Verlust an somatischen Stammzellen bzw. der Stammzellaktivität führt langfristig zu einer verringerten Regenerationsfähigkeit innerhalb entsprechender Gewebe (Jones and Rando, 2011; Wang et al., 2011). Eine unkontrollierte Vermehrung von Stammzellen bzw. stammzellähnlichen Zellen kann hingegen als Ursache vieler Tumore angesehen werden (Al-Hajj, 2007; Alison et al., 2011). Die Charakterisierung somatischer Stammzellen trägt deshalb nicht nur wesentlich zum allgemeinen Verständnis der Stammzellbiologie bei, sondern stellt auch eine essentielle Grundlage für die Konzeption neuer, klinischer Therapieansätze in der Regenerations- und Tumormedizin dar.

1.2 Hierarchie somatischer Stamm- und Vorläuferzellen am Beispiel der Hämatopoese

Das hämatopoetische Stamm- und Vorläufersystem gilt als das längste und gründlichste untersuchte somatische Stammzellsystem und ist hierarchisch organisiert (Abb. 1) (Giebel and Punzel, 2008). An der Spitze der Hierarchie stehen multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSZ), deren Entwicklungspotential schrittweise eingeschränkt wird. HSZ bringen zunächst multipotente Vorläuferzellen (HVZ) hervor, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben, jedoch noch alle Blutzellen

hervorbringen können (Christensen and Weissman, 2001; Morrison and Weissman, 1994). Dem klassischen Modell der Hämatopoese zur Folge bringen die multipotenten HVZ lymphatische HVZ hervor, die sogenannten „*common lymphoid progenitors*“ (CLPs) (Karsunky et al., 2008; Kondo et al., 1997; Serwold et al., 2009) bzw. myeloisch spezifizierte HVZ, die „*common myeloid progenitors*“ (CMPs) (Akashi et al., 2000). Über weitere Zwischenformen reifen die Nachkommen dieser Zellen zu differenzierten Blutzellen heran. Aus den CMPs entwickeln sich megakaryozytäre/erythroide Progenitorzellen (MEPs) und Vorläuferzellen der Granulozyten/Macrophagen (GMPs) Linie (Akashi et al., 2000).

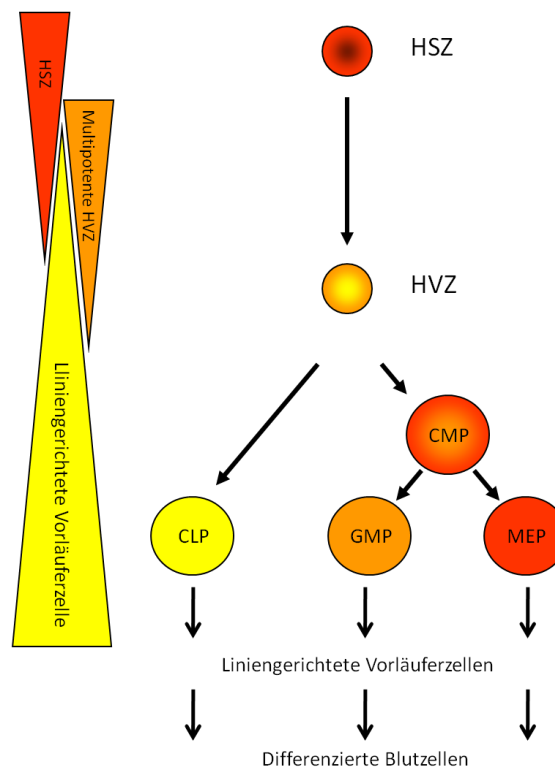


Abb. 1 : Hierarchische Entwicklung des humanen hämatopoetischen Systems.

An der Spitze der Hierarchie steht die multipotente hämatopoetische Stammzelle (HSZ), deren Multipotenz während der Entwicklung zur hämatopoetischen Vorläuferzelle (HVZ) schrittweise eingeschränkt wird. Aus den HVZ können sich sowohl lymphatische (*common lymphatic progenitors*/CMPs) als auch myeloische (*common myeloid progenitors*/CMPs) Progenitoren entwickeln, die ihrerseits über verschiedene Entwicklungsstufen in reife Blutzellen differenzieren. (CMP= `common myeloid progenitor`/allgemeine myeloide Vorläuferzelle; CLP=`common lymphoid progenitor`/allgemeine lymphatische Vorläuferzelle; GMP=`granulocyte macrophage progenitor`/Granulozyten Makrophagen Vorläuferzelle; MEP=`megakaryocyte erythrocyte progenitor`/Megakaryozyten Erythrozyten Vorläufer). Abb. modifiziert nach (Giebel and Punzel, 2008)

Technisch konnte diese Hierarchie mit Hilfe von antikörperbasierenden Strategien wie folgt ermittelt werden. Civin und Kollegen isolierten über den Antikörper My10 eine Population von mononukleären Zellen, die eine 10-100fach höhere koloniebildende Rate (CFU) als die restlichen Zellen aufwiesen (Andrews et al., 1986; Civin et al., 1984; Katz et al., 1985). My10 ist heute als Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD34 bekannt. Untersuchungen des Entwicklungspotentials der CD34 positiven (CD34⁺) Zellen in *in vivo* Transplantationsmodellen und auf klonaler Ebene *in vitro* zeigen, dass nicht alle CD34⁺ Zellen das gleiche Potential besitzen. Daher ist die Population der CD34⁺ Zellen als heterogen anzusehen (Andrews et al., 1992; Cheng et al., 1996). Diese Heterogenität wird durch die Expression des Oberflächenmarkers CD38 reflektiert. Nur CD38⁻ (CD38⁻) negative oder schwach positive (CD38^{dim}) CD34⁺ Zellen bringen Progenitoren lymphatischer und myeloischer Linien hervor (Baum et al., 1992; Bhatia et al., 1998; Huang and Terstappen, 1994). Die Zellen der CD34⁺CD38^{-/dim} Zellfraktion besitzen repopulierende Eigenschaften, wohingegen diese in der CD34⁺CD38⁺ Zellfraktion nicht nachzuweisen sind (Bhatia et al., 1997; Dick et al., 1997). Zur Diskriminierung reiferer Progenitoren werden CD34⁺ Zellen ausgeschlossen, die linienspezifische (*lineage/Lin*) Oberflächenproteine (wie CD4/CD8 (T-Zellen), CD14/CD19 (B-Zellen), CD2/CD56 (Natürliche Killerzellen/NK) und CD15/CD16/CD235a (myeloide/erythroide Zellen) exprimieren (Baum et al., 1992). Eine weitere Diskriminierung primitiver hämatopoetischer Progenitoren erfolgte über das Oberflächenprotein CD133 (Abb. 2) (Miraglia et al., 1997). Die CD133⁺ Zellen innerhalb der CD34⁺Lin⁻CD38^{-/dim} Zellfraktion besitzen die Fähigkeit NOD-SCID (*Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency*) Mausmodelle zu repopulieren und lymphatische als auch myeloische Progenitoren zu bilden (de Wynter et al., 1998). Nicht alle CD34⁺CD133⁺ Zellen besitzen das gleiche Potential, so dass auch die Population der CD34⁺CD133⁺ Zellen als heterogen anzusehen ist.

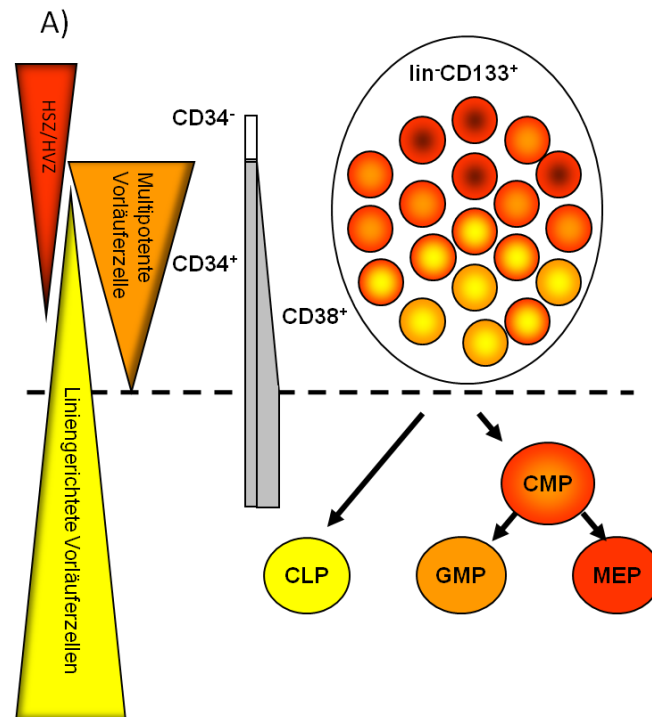


Abb. 2 : Modell zur hierarchischen Entwicklung hämatopoetischer Zellen.

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) lassen sich bis zum heutigen Zeitpunkt nicht isolieren und befindet sich in einem Pool von unreifen Zellen (HVZ). Primitive HSZ/HVZ exprimieren das Oberflächenantigen CD133, welches im Laufe der hierarchischen Entwicklung herunterreguliert wird. Der Oberflächenmarker CD34 wird auf primitiven HVZ exprimiert. Reifere HVZ sind CD38⁺133⁻ und schwächer CD34 positiv. Differenzierte Zellen exprimieren für sie typische Marker (lin); klassisches Model der Hämatopoese modifiziert nach (Giebel and Punzel, 2008); CMP= 'common myeloid progenitor'/allgemeine myeloide Vorläuferzelle; CLP= 'common lymphoid progenitor'/allgemeine lymphatische Vorläuferzelle; GMP= 'granulocyte macrophage progenitor'/Granulozyten Makrophagen Vorläuferzelle; MEP= 'megakaryocyte erythrocyte progenitor'/Megakaryozyten Erythrozyten Vorläufer.

Die in der Hämatopoese entwickelte Methodik, verschiedene Vorläuferzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien über Oberflächenproteine zu diskriminieren, wird heute in vielen Bereichen zur Analyse anderer somatischer Zellsysteme sowie Tumoren angewendet.

1.3 Tumorstammzellen

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Tumore aus einem heterogenen Zellgemisch bestehen, in denen die Frequenz, mit der Tumorzellen neue Tumore initiieren können, stark variiert (Bruce and Van Der Gaag, 1963; Hewitt, 1958; Makino, 1956). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass Tumore Karikaturen normal entwickelter

Gewebe darstellen (Pierce and Speers, 1988), welche ebenfalls einer hierarchischen Organisation unterliegen (Dick, 2009). Dieses Modell stand dem stochastischen Modell gegenüber, in dem jede Tumorzelle nach richtiger Induktion das Potential besitzt, funktionell als Tumorstammzelle (TSZ) zu fungieren.

In den 90er Jahren zeigte die Arbeitsgruppe von J. Dick mit einer Reihe von Versuchen erstmalig, dass in verschiedenen Formen der akuten myeloischen Leukämie (AML) (M1, M4 und M5) eine hierarchisch organisierte Entwicklung beschrieben werden kann. Wie aus der normalen Hämatopoese bekannt, gingen auch aus der leukämischen $CD34^+CD38^-Lin^-$ Population $CD38^+Lin^+$ Zellen hervor. Ebenfalls konnte durch Transplantationsversuche gezeigt werden, dass Zellen der Subpopulation $CD34^+CD38^-$, und nicht der $CD34^+CD38^+$ Subpopulation, das Potential besitzen, NOD-SCID Mäuse zu repopulieren (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Dadurch gelang es, die primitiven Zellen innerhalb der heterogenen Zellpopulation des normalen und leukämischen hämatopoetischen Systems mit den gleichen Oberflächenmarkern (CD34 und CD38) anzureichern (Dick et al., 1997).

Nachdem für Leukämiezellen gezeigt werden konnte, dass nur bestimmte Zellen Tumore initiieren können, wurden in einer ähnlichen Vorgehensweise Zellen verschiedener Subpopulationen solider Tumore auf eine Heterogenität hin untersucht.

In einer Reihe solider Tumore kann das Potential, die Tumorbildung in NOD-SCID Mäusen zu initiieren, auf Zellen kleiner Subpopulationen zurückgeführt werden, die sich meist durch die Expression bekannter Stammzellsurrogatmarker auszeichnen. So exprimieren beispielsweise neurale Stammzellen, wie auch HSZ, das Oberflächenantigen CD133 (Uchida et al., 2000). Transplantationsversuche von Gliomazellen in das Gehirn von immundefizienten Mäusen zeigen, dass 100 $CD133^+$ humane Gliomazellen ausreichen, um die Entwicklung eines Glioms zu initiieren. Im Gegensatz dazu bewirkten 10^5 $CD133^-$ Zellen desselben Tumors keine Gliombildung im Empfängertier (Singh et al., 2004). Folglich können auch im neuralen System über das Oberflächenprotein CD133 sowohl Stammzellen als auch TSZ des zentralen Nervensystems angereichert werden.

Ebenso zeigen Transplantationsexperimente verschiedener maligner Zellfraktionen von Brusttumoren in das Brustfett weiblicher immundefizienter Mäuse, dass ausschließlich die $CD44^+CD24^-$ Zellfraktion die Bildung von Brusttumoren initiiert (Al-Hajj et al., 2003). Entsprechend wurden bei der Suche nach Heterogenität auch in anderen Tumoren Subfraktionen von Zellen gefunden, die im Gegensatz zu den übrigen Zellen der Tumore tumorinitiierendes Potential in NOD-SCID Mäusen aufwiesen [$EPCAM^{++}CD44^+$ Zellen aus kolorektalen Karzinomen (Dalerba et al., 2007), $CD44^+CD24^+ESA^+$ Zellen aus Tumoren des Pankreas (Li et al., 2007) und $ABCB5^+$ Zellen aus malignen Melanomen (Schatton et al., 2008)].

Diese Ergebnisse der verschiedenen Tumorentitäten zeigen, dass nicht alle Tumorzellen das Potential zur Expansion und Tumorbildung besitzen sowie aus den Nachkommen tumorinitiierender Zellen verschiedene Tumorzellen differenzieren können.

Verschieden Systeme, die mutmaßlich einer Heterogenität unterliegen, konnten somit bereits über Marker beschrieben werden. Die resultierende Fraktionierung verschiedener Subpopulationen ermöglicht die Identifizierung primitiver Zellen. Durch die Separation primitiver Zellen können in Analyseverfahren deren Mechanismen, welche an der Regulation Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von Stammzellen beteiligt sind, untersucht werden.

1.4 Mechanismen Selbsterneuerung *versus* Differenzierung

Das Zellschicksal einer Zelle kann sowohl von äußeren (extrinsischen) als auch inneren (intrinsischen) Faktoren beeinflusst werden.

Ein Modell, in dem mehrere extrinsische Faktoren zum Stammzellerhalt beitragen, stellt eine spezielle Mikroumgebung, die Stammzellnische, dar. Die Existenz der hämatopoetischen Stammzellnische, erstmalig 1978 von Raymond Schofield postuliert (Schofield, 1978), wurde im Säugersystem im Endosteum des Knochenmarks und in der Umgebung der sinusoidalen Endothelzellen in der Milz nachgewiesen (Calvi et al., 2003; Kiel et al., 2005; Zhang et al., 2003). Die sich in der Nische befindenden Zellen

wie Osteoblasten und Endothelzellen induzieren die Aktivierung des Notch-Signalwegs in den HSZ, welcher entscheidend für den Stammzellerhalt ist (Butler et al., 2010; Calvi, 2006; Calvi et al., 2003).

Das Modell der asymmetrischen Zellteilung beschreibt einen intrinsischen Faktor, durch den zwei Tochterzellen entstehen, von denen eine Stammzellcharakteristika behält, während die andere Tochterzelle in verschiedene Gewebetypen ausdifferenzieren kann (Knoblich, 2008).

Der Vergleich von Differenzierung und Koloniebildungsfähigkeit verschiedener humaner hämatopoetischer Tochterzellen belegen, dass gepaarte Tochterzellen individueller HVZ nicht funktionell äquivalent sind und sich zu Nachkommenschaften mit unterschiedlichem Potential entwickeln können (Congdon and Reya, 2008; Punzel et al., 2003). Das Vorhandensein einer Asymmetrie wurde unter anderem von unserer Arbeitsgruppe durch den Nachweis von asymmetrisch verteilten Proteinen (CD53, CD62L, CD63 und CD71) in 20 % der teilender HVZ belegt (Beckmann et al., 2007).

Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass sich in der Entwicklung der sensorischen Organe die Sinnesorganmutterzellen (SMZ) nach einem stereotypen Muster zweimal asymmetrisch teilen, wodurch ein aus vier Zellen bestehendes äußeres Sinnesorgan entsteht (Hartenstein and Posakony, 1989). Während beider Zellteilungen kommt es zu einer ungleichen Verteilung des Proteins Numb (Rhyu et al., 1994; Uemura et al., 1989). In der Zelle, die nach der Teilung Numb erhält, wird die Translokation der intrazellulären Domäne von Notch in den Kern nach Aktivierung des Signalwegs durch Delta oder Serrate verhindert (1.4.1) (Guo et al., 1996). Zellen, die kein Numb enthalten, sind in der Lage, das Notch-Signal weiterzuleiten und realisieren somit ein anderes Zellschicksal.

Der Notch-Signalweg stellt einen der essentiellen Signaltransduktionsmechanismen dar, der an der Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung sowohl in der Stammzellnische als auch bei der asymmetrischen Zellteilung beteiligt ist (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Furman and Bukharina, 2011; Weber and Calvi, 2010). Da der Notch-Signalweg in unserer Arbeitsgruppe seit längerem analysiert wird (Giebel, 1999;

Giebel and Campos-Ortega, 1997; Giebel, 2012; Hinz et al., 1994) und auch Gegenstand dieser Arbeit ist, soll er im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.4.1 Der Notch-Signalweg in *Drosophila*

Mutationen von Notch wurden in der Taufliege *Drosophila melanogaster* 1917 von Thomas Hunt Morgan aufgrund einer Merkmalsbeschreibung, welche sich als Einkerbung (engl. *notch*) im Flügelrand äußerte, beschrieben. Die Kernkomponenten des Notch-Signalwegs in *Drosophila* stellen der Rezeptor Notch, die Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser), sowie der Effektor Suppressor of Hairless (Su(H)) dar.

Durch Bindung der Liganden Delta oder Serrate wird der Notch-Rezeptor gespalten und die intrazelluläre Domäne (NICD) freigesetzt. NICD wirkt als Signalüberträger und gleichzeitig als transkriptioneller Ko-Aktivator der Notch-Zielgene. Im Zellkern baut sich ein Aktivorkomplex aus mehreren Proteinen auf. Im Zentrum steht das DNA-Bindeprotein Su (H), das an NICD sowie an Mastermind (Mam) bindet, welches ebenfalls als Koaktivator wirkt. Als Antagonist von Notch in *Drosophila* ist Hairless bekannt, welcher gemeinsam mit Su(H) und den Korepressoren Groucho (Gro) und C-terminalem Bindeprotein (CtBP) einen Repressorkomplex aufbaut und die Transkription der Notch-Zielgene hemmt. Hierbei bindet Hairless direkt an Su(H) und an die beiden Korepressoren.

Seit der Charakterisierung des Notch-Gens im Jahr 1985 (Wharton et al., 1985) stellte sich heraus, dass der Notch-Signalweg im Tierreich in allen untersuchten Metazoen (von der Seescheide bis zum Menschen) hochkonserviert vorliegt. In all diesen Organismen stellt der Notch-Signalweg einen wichtigen Regulator in der Spezifizierung von Zellen dar, indem er verschiedene Aspekte in der Differenzierung von Zellen steuert (Lai, 2004; Wu et al., 2010).

1.4.2 Notch1

Im humanen System entspricht Notch1 dem Homolog aus *Drosophila*. Notch1 besteht aus einer extrazellulären und intrazellulären Untereinheit. Charakteristisch für die größere extrazelluläre Untereinheit von Notch1 sind 36 EGF- (*Epidermal Growth Factor*) ähnliche repetitive Sequenzen, durch welche die Interaktion mit dem Liganden vermittelt wird (Rebay et al., 1991). Darauf folgt eine regulatorische Region, die sich aus drei cysteinreichen repetitiven Sequenzen und einer Heterodimerisierungsdomäne zusammensetzt. Hierbei wird angenommen, dass dieser Bereich eine Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit eines Liganden verhindert (Gordon et al., 2007). Die zweite Untereinheit wird aus der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (NICD) gebildet (Aster et al., 2008; Gordon et al., 2008).

NICD1 dient der Signalweiterleitung nach Aktivierung und besteht u.a. aus einer RAM-Domäne (RBPjk assoziiertes Modul), sechs Ankyrin- (ANK) Domänen und zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) (Zweifel and Barrick, 2001). Die RAM- und die ANK-Domäne vermitteln die Interaktion mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor RBPjk (Tamura et al., 1995). Zudem fungiert die ANK-Domäne als Bindestelle für Deltex und Mastermind, Modulatoren des Notch-Signalwegs (Rebay et al., 1993).

1.4.2.1 Realisatorgene von Notch1

Zielgene des Notch-Signalwegs in *Drosophila*, die essentielle Mediatoren des Notch-Signalwegs kodieren, sind *hairy* und Gene des *Enhancer-of-Split* (*E(SPL)*) Komplexes. Homologe Gene in Säugern werden entsprechend als „*Hairy and Enhancer of split*“ (*hes*) und „*Hes related repressor protein*“ (*hey*) bezeichnet (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Jarriault et al., 1995). Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Familie.

Die bHLH-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine evolutionär konservierte Domänenstruktur aus. Die N-terminal gelegene basische Domäne hat einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren und kann sequenzspezifisch mit DNA interagieren. Die direkt benachbarte Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne wird durch zwei amphipathische α -Helices gebildet, die durch einen kurzen Linker miteinander

verbunden sind. Über diese Domäne können bHLH-Transkriptionsfaktoren Homo- oder Heterodimere ausbilden. Diese Dimere bilden wiederum eine scherenförmige Struktur, die über die basische Domäne an die DNA bindet (Murre et al., 1989; Shimizu et al., 1997).

C-terminal der bHLH-Domäne liegt bei den Hey- und Hes-Proteinen die Orange-Domäne, bestehend aus zwei α -Helices, die als zusätzliche Protein-interagierende Domäne fungiert (Dawson et al., 1995). Charakteristisch für die Hairy und E(spl)-Proteine sind ein konserviertes Prolin in der basischen Domäne und ein C-terminales WRPW-Motiv, das den Korepressor Groucho bindet. Hes-Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich zu Hairy und E(spl). Hey-Proteine hingegen besitzen an der Stelle des konservierten Prolins ein Glycin und C-terminal das YXXW-Motiv (YRPW für humanes Hey1 und humanes Hey2, YHSW für humanes HeyL) (Davis and Turner, 2001). Im Gegensatz zum WRPW-Motiv der Hes-Proteine, bindet das YXXW-Motiv nicht an den Korepressor Groucho/TLE1-4 (Fischer et al., 2002; Iso et al., 2001b; Pichon et al., 2004).

Direkte Zielgene von Notch in Säugern sind aus der Hes-Familie Hes1, Hes5 und Hes7 und die gesamte Hey-Genfamilie (Hey1, Hey2 und HeyL) (Iso et al., 2001a; Kokubo et al., 1999; Leimeister et al., 1999). Dabei fungieren sie als transkriptionelle Repressoren und unterdrücken die Expression nachgeschalteter Gene, welche für gewebespezifische Transkriptionsaktivatoren kodieren.

1.4.2.2 Liganden von Notch1

Der Notch-Signalweg wird durch Liganden der DSL Familie, welche nach Delta und Serrate in *Drosophila* und LAG-2 in *Caenorhabditis elegans* benannt sind, aktiviert.

Für das humane System werden zwei Liganden-Familien beschrieben: Serrate-ähnliche Liganden mit Jagged 1 und 2 sowie Delta-ähnliche Liganden (*Deltalike*/DII) DII 1,3 und 4 (Lindsell et al., 1995; Luo et al., 1997). Durch Ligandenbindung an das DSL-Motiv der extrazellulären Region des Notch-Rezeptors wird der Notch-Signalweg aktiviert (Gallahan and Callahan, 1997; Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996). Wie die Notch-Rezeptoren sind auch die Notch-Liganden Typ 1 Transmembranproteine, die im

extrazellulären Teil aus EGF-ähnlichen repetitiven Sequenzen sowie einer DSL-Domäne bestehen (D'Souza et al., 2008).

1.4.2.3 Der kanonische Notch-Signalweg im Säugersystem

Wie in *Drosophila melanogaster* fungiert Notch im Säugersystem als Oberflächenrezeptor, der nach Aktivierung die Genexpression reguliert (Abb. 3). Zur Aktivierung und Signalübertragung des Rezeptors sind drei proteolytische Prozessierungsschritte erforderlich.

Notch wird im Trans-Golgi-Netzwerk konstitutiv durch eine Furin ähnliche Konvertase innerhalb der extrazellulären Domäne gespalten (Logeat et al., 1998). Die hierbei entstehende extrazelluläre Domäne (NECD) und die transmembran-/intrazelluläre Domäne (NICD) werden durch nicht kovalente Bindung zusammengehalten und bilden den funktionellen Rezeptor (Aster et al., 2008; Gordon et al., 2008). In dieser heterodimeren Form wird Notch auf der Zelloberfläche präsentiert und kann von einem Liganden der DSL-Familie einer benachbarten Zelle aktiviert werden.

Die Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden bewirkt eine Konformationsänderung, durch welche die Metalloprotease ADAM17 binden kann und die extrazelluläre Domäne von Notch abspaltet (Brou et al., 2000). Die Abspaltung von NICD von der Transmembrandomäne erfolgt dann durch den γ -Sekretasekomplex Presenilin und bewirkt vermutlich die Freisetzung von NICD ins Zytoplasma (De Strooper et al., 1999; Kopan and Ilagan, 2009). Von dort aus wandert NICD in den Zellkern und rekrutiert Koaktivatoren (CoA) wie Mastermindlike1 (MAML1) (Wu et al., 2000), welches hierbei an die ANK-Domäne von NICD bindet und andere transkriptionale Aktivatoren mit einbezieht (Jeffries et al., 2002). Nach der Bildung dieses Komplexes interagiert NICD mit dem Transkriptionsfaktor RBPjk, welcher daraufhin von einem transkriptionellen Repressor zu einem transkriptionellen Aktivator umgewandelt wird. Infolgedessen können die Notch-abhängigen Zielgene exprimiert werden (Kovall, 2008). *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass verkürzte Mutanten von MAML1 (dominant negatives MAML1/dnMAML1), welche nur die N-terminale NICD Bindedomäne besitzen, einen dominant negativen Effekt auf NICD bewirken (Fryer et al., 2002; Lin et al., 2002) und

somit als direkter Inhibitor des Notch-Signalwegs fungieren können (Maillard et al., 2004).

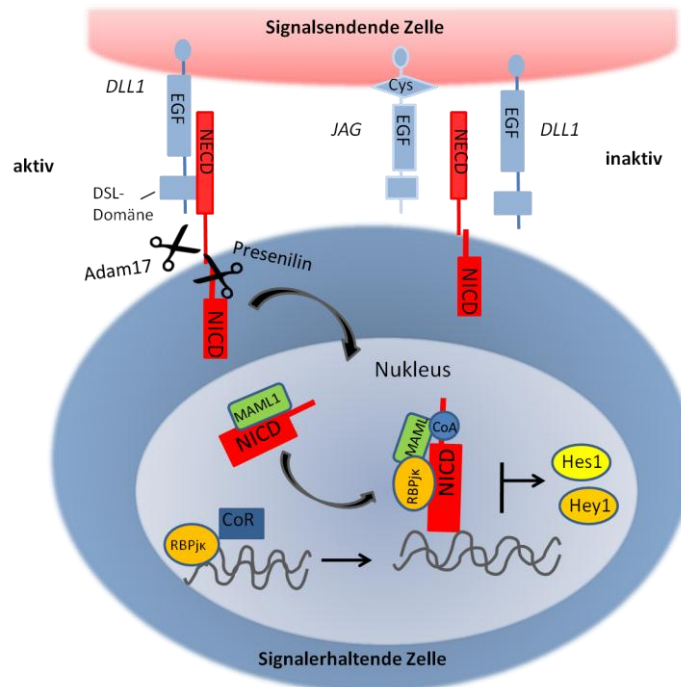


Abb. 3 : Kanonische Notch-Signalweg.

Der Notch-Signalweg wird durch die Interaktion der Liganden-exprimierenden und Notchrezeptor-exprimierenden Zelle aktiviert. Nach Bindung des Liganden (DLL/JAG) an die extrazelluläre Domäne des Notchrezeptors (NECD) erfolgt die proteolytische Spaltung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD), welche anschließend in den Kern wandert. Im Kern rekrutiert NICD Koaktivatoren (CoA) wie Mastermindlike1 (MAML1). Dies führt zu einer Umwandlung des transkriptionellen Repressors RBPjk zu einem Aktivator und bewirkt unter anderem die Transkription der Zielgene (Hey1, Hes1). (Abbildung modifiziert nach (Ranganathan et al., 2011); Cys: cysteinreiche Domäne; DLL: Delta-like, DSL: Delta Serrate Lag2; EGF: epidermaler Wachstumsfaktor; Hes1: hairy and enhancer of split 1; Hey1: Hes-related repressor protein; JAG: Jagged

1.4.3 Numb als Modulator von Notch

Die Zellschicksalsdeterminante Numb ist ein zytoplasmatisches, den Notch-Signalweg negativ regulierendes Protein (Hartenstein and Posakony, 1989). Wie bereits erwähnt (1.4), führt bei *Drosophila* während der Entwicklung des peripheren Nervensystems eine asymmetrische Verteilung von Numb auf die Tochterzellen zu unterschiedlichen Zellschicksalen: In Zellen mit Numb wird die Notch-Signaltransduktion unterdrückt und so die neuronale Differenzierung eingeleitet.

Im humanen System liegt Numb in vier Isoformen vor, dabei scheinen Numb1 und Numb2 überwiegend plasmamembrangebunden vorzuliegen, während Numb3 und Numb4 zytosolisch vorzuliegen scheinen (Dho et al., 1999). Alle Numb-Isoformen enthalten eine Phosphotyrosinbindedomäne (PTB), die der Interaktion mit verschiedenen Proteinen dient (Li et al., 1997; Li et al., 1998; Zwahlen et al., 2000). Die Isoformen Numb1 und Numb2 besitzen eine längere Variante der PTB Domäne (PTBL) als die Varianten Numb3 und Numb4 (PTBS). Die Isoformen Numb2 und Numb4 enthalten eine verkürzte Variante der prolinreichen Region (PRR) am C-Terminus des Proteins (Abb. 4). Diese PRR-Domäne weist mehrere SH3-Bindemotive (PXXP), ein Eps15- sowie ein α -Adaptin Bindemotiv auf (Smith et al., 2004), über das Numb mit α -Adaptin (Berdnik et al., 2002) und Proteinen mit einer Eps15-homologen-Domäne, die als Regulatoren des Endozytosenetzwerkes gelten (Sato et al.; Smith et al., 2004), interagieren kann.

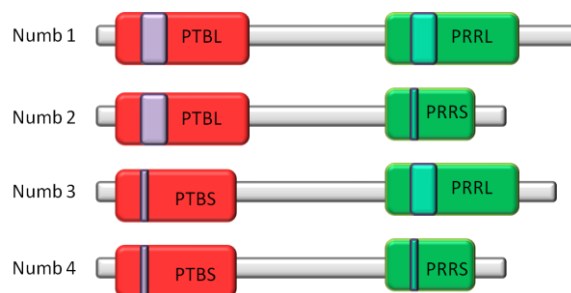


Abb. 4 : In Säugern existieren vier Numb-Isoformen.

Numb1 und Numb2 besitzen die große PTB Domäne (PTBL), wohingegen Numb3 und Numb4 die kleine PTB Domäne (PTBS) besitzen. Der C-Terminus der vier Numb-Isoformen unterscheidet sich bezüglich der Länge der PRR Domäne: Numb 1 und 3 besitzen eine verkürzte PRR Domäne (PRRS) und Numb2 und 4 eine längere Variante (PRRL). (Abbildung modifiziert nach (Verdi et al., 1996))

Numb fördert in Säugern die Ubiquitinierung des membrangebundenen Notch1 sowie die proteasomale Degradation von NICD (McGill and McGlade, 2003). Für die vermittelte Degradation von Notch1 sowie von NICD ist demnach die Phosphotyrosinbindedomäne (PTB) von Numb erforderlich (McGill and McGlade, 2003). Die durch Numb vermittelte Ubiquitinierung von Notch1 wird durch die Interaktion von Numb mit der E3 Ligase *Itchy* (Itch) induziert. Es wird vermutet, dass

Numb nach Bindung an Notch1 als Adapter für Itch und andere Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie fungiert und diese rekrutiert, wodurch die Ubiquitinierung von Notch1 an der Zellmembran begünstigt wird. Durch die Ubiquitinierung wird die Degradation von NICD gefördert und die Translokation von NICD in den Kern verhindert, wodurch die Zielgene von Notch nicht transkribiert werden können (McGill and McGlade, 2003). Itch gehört zur Familie der Nedd4/Rsp5p E3-Ubiquitinligasen, welche sowohl Transmembranproteine durch Monoubiquitinierung als auch zytoplasmatische Proteine durch Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation herunterregulieren können (Rotin et al., 2000). Die Monoubiquitinierung von Oberflächenrezeptoren löst deren Internalisierung aus und einen anschließenden Abbau in Lysosomen (Rotin et al., 2000).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Notch1 konstitutiv von der Plasmamembran in endozytotische Sortierungskompartimente internalisiert wird. Von dort wird es dann entweder zurück an die Zelloberfläche geführt (recycelt) oder in späten Endosomen degradiert (Chastagner et al., 2008; McGill et al., 2009). Es wird vermutet, dass NICD erst in den endozytotischen Kompartimenten durch die γ -Sekretase gespalten wird und anschließend in den Kern wandern kann (McGill et al., 2009). Hierbei scheint Numb die Sortierung von Notch1 in die späten Endosomen zu fördern, indem es Notch1 von dem konstitutiven Weg des Recyclings in ein spätes endosomales Kompartiment dirigiert (McGill et al., 2009). Dieser Schritt scheint wiederum abhängig von der Interaktion zwischen Numb und Itch zu sein, da nur ubiquitinierte Rezeptoren in die späten Endosomen geleitet werden können (Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004).

Numb gibt demnach den intrazellulären Weg vor, den Notch1 durch den endozytotischen Sortierungskomplex nimmt. Infolgedessen würde Numb die Anzahl von aktivierbarem Notch1 regulieren (Le Borgne et al., 2005; McGill et al., 2009).

1.5 Endotheliale Vorläuferzellen

Endotheliale Vorläuferzellen (EVZ) gewinnen aufgrund ihrer Rolle bei der Revaskularisation von verletzten, ischämischen und regenerierenden Organen eine immer größer werdende klinische Bedeutung, da eine rasche Revaskularisation essentiell für den funktionellen Erhalt der betroffenen Organe ist (Carmeliet, 2003; Potente et al., 2011). Ihre Beteiligung an dem Prozess der Angiogenese (Herbert and Stainier, 2011) eröffnet die Möglichkeit, EVZ zu implantieren, um den eingeschränkten Prozess der Wundheilung bei Patienten mit vermindertem Angiogenesepotential zu behandeln (Shepherd et al., 2006). EVZ stellen eine Zellressource für die artifizielle Vaskularisierung von Transplantaten dar, damit diese ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Au et al., 2008; Levenberg et al., 2005; Rouwkema et al., 2009; Tremblay et al., 2005). In den letzten Jahren wurden verschiedene Endothelentitäten mit gefäßbildendem Potential beschrieben, welche im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

1.5.1 Endotheliale- und Endothel-ähnliche Vorläuferzellen

Eine endotheliale Zellquelle stellen die humanen umbilikalen Venenendothelzellen (*human endothelial colony forming cells*/HUVECs) dar, welche bereits Mitte der 1970er als humane *in vitro* kultivierbare Endothelzellen beschrieben wurden (Booyse et al., 1981; Gimbrone et al., 1974; Maciag et al., 1982). *In vitro* repräsentieren HUVECs robust proliferierende EVZ, deren Proliferation durch eine bestimmte erreichte Dichte inhibiert wird.

Zur Beschreibung von HUVECs und zur Diskriminierung von anderen Zelltypen werden verschiedene endotheltypische Charakteristika verwendet (Tab. 1): Morphologisch bilden HUVECs keine multidimensionalen Kolonien aus (Gimbrone et al., 1974). Endothelzellen können durch ihre Fähigkeit, AcLDL aufzunehmen (Voyta et al., 1984) und das Lektin *Ulex europaeus I agglutinin* (UEA I) zu binden (Holthofer et al., 1982), von Perizyten und glatten Muskelzellen diskriminiert werden. Zur Unterscheidung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen wird die Expression verschiedener Oberflächenantigene verwendet: Hierbei gelten CD31, CD105, CD144, CD146 und

VEGF-R2 als Endothel-typische Oberflächenantigene und CD14 und CD45 als hämatopoetische Oberflächenmarker (Ingram et al., 2005). Der Nachweis des Proteins „von Willebrand Faktor“ (vWF), der als Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII eine wichtige Rolle bei der Blutstillung spielt und in Endothelzellen in den sogenannten *Weibel-Palade-bodies* (WPB) gelagert wird, wird ebenfalls zur Beschreibung von Endothelzellen verwendet (Valentijn et al., 2011).

Neben den HUVECs werden gegenwärtig die zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen und die endothelialen koloniebildenden Zellen als endotheliale Vorläuferzellen diskutiert:

Zirkulierende endotheliale Vorläuferzelle (zEVZ). Eine entscheidende Rolle bei der Neubildung von Gefäßen kann bei aus dem Knochenmark stammenden Zellen nachgewiesen werden, welche erstmalig 1997 von Asahara *et al.* aus dem peripheren Blut angereichert wurden (Asahara et al., 1997; Rafii and Lyden, 2003; Urbich and Dimmeler, 2004). Zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen exprimieren sowohl die für Endothelzellen typischen Antigene CD31, CD62E, VEGF-R2, den Angiopoietin Rezeptor Tie-2 als auch das für hämatopoetische Zellen charakteristische Oberflächenantigen CD45. Aufgrund der Präsenz von endothelialen und hämatopoetischen Oberflächenantigenen auf der Oberfläche dieser Zellen wird diese von Asahara *et al.* als Endothel-bildende hämatopoetische Stammzelle bezeichnet, welche *in vitro* zur endothelialen Vorläuferzelle (EVZ) differenziert (Asahara et al., 1997).

Endotheliale koloniebildende Zelle (endothelial colony forming cells/ECFCs). ECFCs sind HUVEC-ähnliche Zellen, die aus Nabelschnurrestblut und peripherem Blut isoliert werden können (Ingram et al., 2004). Sie zeichnen sich durch ein robustes proliferatives Potential aus (Case et al., 2007), binden UEA-I und nehmen AcLDL auf (Yoder et al., 2007). Immunophänotypisch exprimieren sie die Endothel-typischen Oberflächenantigene CD31, CD105, CD144, CD146 und VEGF-R2; sie exprimieren weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene das für hämatopoetische Zellen typische CD45 oder das für Makrophagen-typische CD115 (Yoder et al., 2007). *In vitro* bilden ECFCs

tubulärartige Strukturen in 3D-Matrices, wie Kollagen oder Matrigel, aus (Sieveking et al., 2008).

Weiterhin wurden folgende Eigenschaften von zEVZ und ECFCs miteinander verglichen: zEVZ unterstützen den Prozess der Neoangiogenese, indem sie sich in bereits neu gebildete Gefäße integrieren, jedoch können sie selbst keine Gefäßbildung induzieren (Case et al., 2007; Kalka et al., 2000; Vasa et al., 2001; Yoder et al., 2007). ECFCs bilden funktionelle Blutgefäße *de novo* aus, wenn diese in einer 3D-Matrix aus Kollagen und Fibronectin in die Flanke einer immungeschwächten Maus transplantiert werden (Yoder et al., 2007).

Ein Charakteristikum von Makrophagen stellt ihre Fähigkeit dar, Bakterien zu phagozytieren (Hume et al., 2002). Ein Vergleich zeigte, dass ECFCs und HUVECs im Gegenteil zu zEVZ und der murinen Makrophagenlinie J774 keine *Escherichia coli* phagozytieren (Yoder et al., 2007).

Der Vergleich von zEVZ und ECFCs lässt darauf schließen (zusammengefasst in Tab. 1), dass zEVZ eine Subpopulation endothelmimikrierender, hämatopoetischer, adhärent werdender Monozyten/Makrophagen darstellen (Hirschi et al., 2008). Für diese Arbeit wurden aufgrund dieser Resultate neben HUVECs die HUVEC-ähnlichen ECFCs als Zellquelle endothelialer Vorläuferzellen gewählt.

Tab. 1: Vergleich von zEVZ, ECFCs und HUVECs.

	zEVZ	ECFCs	HUVECs
Endothelialer Immunphänotyp	einige Zellen: CD31 ⁺ CD105 ⁺ CD144 ⁺ CD146 ⁺ VEGF-R2 ⁺	alle Zellen: CD31 ⁺ CD105 ⁺ CD144 ⁺ CD146 ⁺ VEGF-R2 ⁺	alle Zellen: CD31 ⁺ CD105 ⁺ CD144 ⁺ CD146 ⁺ VEGF-R2 ⁺
Bindung von <i>Ulex europaeus</i> -I	ja	ja	ja
vWF	pos	pos	pos
Aufnahme von AcLDL	ja	ja	ja
Hämatopoetischer Immunphänotyp	ja (CD45 ⁺ CD14 ⁺)	nein (CD45 ⁻ CD14 ⁻)	nein (CD45 ⁻ CD14 ⁻)
Expression Makrophagentypischer Marker	ja (CD115 ⁺)	nein (CD115 ⁻)	nein (CD115 ⁻)
Expression auf RNA-Ebene	CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD115 ⁺	CD45 ⁻ CD14 ⁻ CD115 ⁻	CD45 ⁻ CD14 ⁻ CD115 ⁻
Phagozytose von Bakterien	ja	nein	nein
Vaskularisierung immundefiz. Mäuse	nein	ja	ja

1.5.2 *In vitro* weisen ECFCs/HUVECs eine hierarchische Entwicklung auf

Werden zur Untersuchung des Proliferationspotentials von ECFCs und HUVECs einzelne Zellen für 14 Tage kultiviert und die Koloniebildungsrate analysiert, zeigt sich, dass 55 % der ECFCs und 52 % der HUVECs nach Einzelzellablage teilungsfähig sind und die gebildeten Kolonien unterschiedliche Größen aufweisen (Ingram et al., 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wird geschlussfolgert, dass die initiale Kolonie aus unterschiedlich primitiven endothelialen Vorläuferzellen besteht, in der die primitivsten endothelialen Vorläuferzellen das höchste koloniebildende Potential besitzen. ECFCs und HUVECs würden somit *in vitro* eine Hierarchie unterschiedlicher Progenitorzellen ausbilden (Ingram et al., 2005; Ingram et al., 2004). Für die Diskriminierung in primitive und reife Subpopulationen innerhalb dieser Hierarchie sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Oberflächenmarker identifiziert worden (Abb. 5) (Ingram et al., 2004; Nagano et al., 2007a).

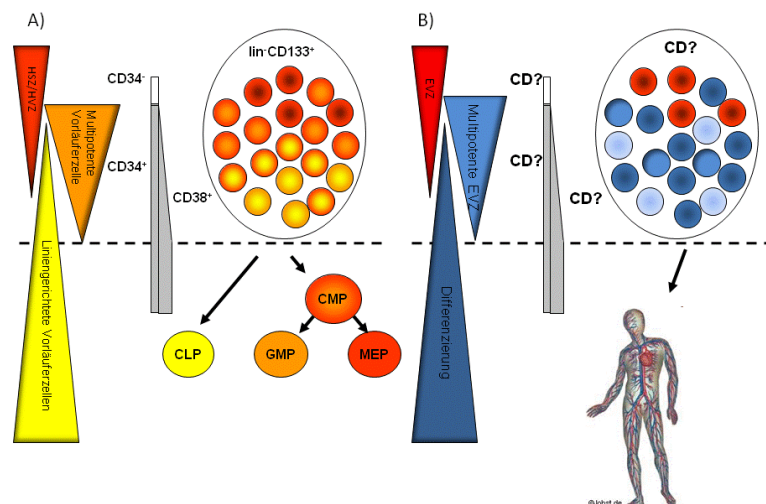


Abb. 5 : Modell des Entwicklungsverlaufs somatischer HSZ und ESZ.

(A) Die hämatopoetische Stammzelle befindet sich in einer Zellpopulation, bestehend aus Stamm- (HSZ) und Vorläuferzellen (HVZ). Die hierarchische Entwicklung der HSZ/HVZ kann mit der Hilfe von Oberflächenantigenen beschrieben werden. Differenzierte Linien exprimieren für sie typische Marker (lin); (klassisches Modell der Hämatopoese modifiziert nach (Giebel and Punzel, 2008); (B) Darstellung der heterogenen Zellpopulation von endothelialen Vorläuferzellen (EVZ), deren Diskriminierung über Oberflächenantigene zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich ist, orientiert an dem hierarchischen Modell der Hämatopoese (Modifiziert nach (Giebel and Punzel, 2008); ESZ=endotheliale Stammzelle; EVZ=endotheliale Vorläuferzelle; HSZ=hämatopoetische Stammzelle; HVZ=hämatopoetische Vorläuferzelle; CMP='common myeloid progenitor'/allgemeine myeloide Vorläuferzelle; CLP='common lymphoid progenitor'/allgemeine lymphatische Vorläuferzelle; GMP='granulocyte macrophage progenitor'/Granulozyten Makrophagen Vorläuferzelle; MEP='megakaryocyte erythrocyte progenitor'/Megakaryozyten Erythrozyten Vorläufer

1.6 Fragestellung

Wie unter 1.5.2 geschildert, bilden endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) und humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVECs) ähnlich wie primitive hämatopoetische Zellen eine Hierarchie unterschiedlicher Progenitorzellen aus, für deren Diskriminierung bisher noch keine Oberflächenmarker identifiziert worden sind (Ingram et al., 2004; Nagano et al., 2007b). Aufgrund der Tatsache, dass wir ECFCs/HUVECs sowohl durchflusszytometrisch wie auch morphologisch als äußerst heterogene Zellpopulation darstellen können, sind wir in der Lage, einzelne Teilpopulationen durchflusszytometrisch voneinander zu trennen und sowohl funktionell als auch deskriptiv zu analysieren. In Analogie zu der in der Hämatopoese entwickelten Methodik, verschiedene Vorläuferzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien über Oberflächenproteine zu diskriminieren, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen mit Hilfe von Zelloberflächenmarkern dargestellt werden. Ebenfalls sollte über diese Hierarchie Aufschluss über ihr Proliferationspotential und deren Differenzierungszustand gegeben werden.

Da der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle im Prozess Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von Zellen spielt (Bigas and Espinosa, 2012; Herbert and Stainier, 2011), sollte im weiteren Verlauf der Einfluss des Notch-Signalwegs auf die hierarchische Entwicklung untersucht werden. Es wurden Komponenten des Notch-Signalwegs lentiviral in HUVECs transduziert und der Einfluss auf das Zellschicksal dieser Zellen analysiert. Ebenfalls wurde ein möglicher modulativer Einfluss von Numb und Numblike auf den Notch-Signalweg durch Analysen des Funktionszugewinns (*gain of function*) und Funktionsverlustes (*loss of function*) untersucht.

Mögliche Effekte des überexprimierten oder herunterregulierten Proteins auf die hierarchische Entwicklung der endothelialen Vorläuferzellen sollten über das Proliferationspotential und das Koloniebildungspotential der Zellen sowie mit Hilfe von funktionellen Analyseverfahren untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Übersicht über die verwendeten Kits und Assays

Bezeichnung	Firma
Apo One Kit	Promega
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
RNeasy Microkit	Qiagen

2.1.2 Übersicht über die verwendeten Medien/Medienzusätze

Bezeichnung	Firma
EGM-2 bullet kit	Lonza
DMEM 4,5g/l Glukose	PAA
FBS	Biochrom
L-Glutamin	Gibco
Pen/Strep 100x	Gibco

2.1.3 Antikörper und Seren

2.1.3.1 Übersicht über die verwendeten konjugierten Antikörper

Bezeichnung	Markierung	Klon	Firma	Bezeichnung	Markierung	Klon	Firma
CD2	PE	S5.2	Immunotech	CD62L	Fitc	DREG56	Immunotech
CD4	PE	RPA-T4	BD	CD62P	Fitc	AK-4	BD
CD7	Fitc	MEM-186	Exbio	CD63	Fitc	H5C6	BD
CD8	Fitc	HIT8a	BD	CD71	Fitc	YDJ1.2.2	Immunotech
CD9	Fitc	MEM-61	EuroBioScience	CD74	Fitc	M-B741	BD
CD10	PE	HI10a	Immunotech	CD79b	PE	CB3-1	Beckmann Coulter
CD11a	PE	25.3	Immunotech	CD81	PE	JS-81	BD
CD11b	PE	Bear1	Immunotech	CD83	PE	HB15a	Immunotech
CD11c	PE	BU15	Immunotech	CD87	PE	VIM5	Beckmann Coulter
CD13	Fitc	SJ1D1	Immunotech	CD90	PE	F15-42-1-5	Beckmann Coulter
CD14	PE	M5E2	BD	CD95	Fitc	LT95	Exbio Testalliquot
CD15	Fitc	80H5	Immunotech	CD97	Fitc	VIM3B	BD
CD18	Fitc	7E4	Immunotech	CD99	Fitc	TÜ12	BD
CD24	PE	ML5	BD	CD102	PE	CBR-1C2/2	BD
CD25	Fitc	1HT44HH3	Beckmann Coulter	CD103	PE	2G5	Beckmann Coulter
CD26	Fitc	M-A261	BD	CD106	PE	STA	eBioscience
CD27	Fitc	L128	Immunotech	CD109	PE	TEA2/16	BD
CD28	PE	CD28.2	Immunotech	CD110	PE	BAH-1	BD
CD29	Fitc	K20	Immunotech	CD116	PE	4H1	BioLegend
CD30	PE	HRS4	Immunotech	CD117	PE	95C3	Immunotech
CD31	Fitc	WM59	BD	CD122	PE	CF1	Immunotech
CD33	PE	HIM3-4	Exbio	CD123	PE	6H6	Beckmann Coulter
CD34	Fitc	581	Immunotech	CD126	PE	M91	Beckmann Coulter
CD34	ECD	581	Beckmann Coulter	CD127	PE	R34.34	Beckmann Coulter
CD36	Fitc	CB38	BD	CD131	Fitc	CF1	Immunotech
CD37	Fitc	NMN46	EuroBioScience	CD133	PE	AC133	Millteny
CD38	PE	HIT2	BD	CD135	PE	SF1.340	Beckman Coulter
CD40	PE	MAB89	Immunotech	CD135R			
CD41	PE	P2	Beckmann Coulter	CD138	PE	B838	Beckmann Coulter
CD41a	PE	HIP8	BD	CD144	PE	TEA1/31	Immunotech
CD43	Fitc	1G10	BD	CD146	Fitc	P1H12	eBioscience
CD44	Fitc	J.173	Immunotech	CD150	PE	A12	BD
CD44	APC	1219	BD	CD151	PE	14A2.H1	BD
CD45	Pcy-7	J33	Beckmann Coulter	CD152	PE	BNI3	Immunotech
CD45RA	PE	HI100	BD	CD156b	PE	111633	R&D
CD46	Fitc	J33	Beckmann Coulter	CD164	Fitc	N6B6	BD
CD47	Fitc	B6H12	BD	CD166	PE	3A6	Pharmingen
CD48	Fitc	J4-57	Immunotech	CD184	PE	44717	R&D
CD49b	Fitc	AK-7	BD	CD252	PE	Ik-1	BD
CD49d	Fitc	HP2/1	Immunotech	CD253	PE	75402	R&D
CD49e	PE	L25	BD	CD312	Fitc	2A1	AbD Serotec
CD49f	PE	GoH3	BD	CD324	PE	180224	R&D
CD50	PE	HP2/19	Immunotech	CD333	Fitc	136334	R&D
CD52	PE	HI186	Exbio	BCRP1	Fitc	MAB4155F	
CD53	Fitc	HI29	BioLegend	HLA-ABC	Fitc	IMMU-W6/32	Immunotech
CD54	Fitc	84H10	Immunotech	HLA-DR	PE	IMMU-357	Immunotech
CD55	Fitc	JS11KSC2.3	Immunotech	MDR1	Fitc	17F9	BD
CD56	PE	NCAM16.2	BD	VEGF-R1	PE	49560	R&D
CD58	PE	AICD58	Immunotech	VEGF-R2	PE	89106	R&D
CD59	Fitc	p282(H19)	BioLegend	VEGF-R3	PE	54733	R&D
CD62E	PE	H5C6	BD				

2.1.3.2 Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper und Seren

Sekundäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Firma
Alexa 488	Ziege anti Maus	1:1000 extra; 1:1500 intra	Invitrogen
FAB Cy3	Affe anti Maus	1:50 extra; 1:300 intra	Dianova

Seren	Stock	Konzentration	Firma
Serum aus Maus	50 mg/ml	5-10 %	Dianova
Serum aus Kaninchen	60 mg/ml	5-10 %	Dianova
Serum aus Affe	60 mg/ml	5-10 %	Dianova

2.1.4 Übersicht über die verwendeten Geräte und der dazugehörigen Software

Gerät	Modelbezeichnung	Firma
CO2-Inkubator	Hera Cell240	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	FC500	Beckmann Coulter
	Software: CXP 2.2 und Kaluza 1.1	
	FACS Aria I	BD
	Software: Diva 6.1.2	
Fluorometer	GENios	Tecan
Geldokumentationsgerät	Fusion FX7	Vilber Lourmat
Heizblock	HX-2	peqLab Biotechnologie
Mikroskope	CKX41	Olympus
	Observer Z1	Zeiss
	Software: AxioVision Rel 4.8	
Klimakammer	XL multi S1 1018910	Pecon
Sequenzanalysegerät	ABI PRISM 7900HT Sequence Detectors	Applied Biosystems
	Software: SDS 2.2	
Spektralphotometer	Power wave XS	Biotek
	NanoDrop 1000 Spektralphotometer	peqLab Biotechnologie
Taumler	Typ VX7	Janke & Kunkel electronic
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Zellkulturbank	Hera KS12	Kendro
Zentrifugen	5810R	Eppendorf
	5424	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Verwendete Plasmide zur Herstellung virushaltiger Überstände

Die reverse Transkriptase von Retroviren ermöglicht ihnen, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und diese anschließend in das Wirtsgenom zu integrieren. Durch die Integration der viralen DNA wird das Provirus stabil in das Genom der Zielzelle integriert und während der Zellteilung auf beide Tochterzellen weitergegeben. Dies macht Retroviren zu idealen Vehikeln für den Transfer von Genen in Stammzellen.

Die retroviralen Hüllproteine stellen für die Stabilität der retroviralen Partikel und für den Gentransfer in verschiedene Zielzellen einen limitierenden Faktor der retroviralen Gentransfersysteme dar. Durch die Pseudotypisierung kann der Tropismus des retroviralen Vektors verändert werden. Häufig wird das G-Protein des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G) zur Pseudotypisierung verwendet, da es zu einem sehr breiten Wirtsspektrum der Retroviren führt (Yee et al., 1994). Für diese Arbeit wurde ein foamyviraler Pseudotyp-Vektor verwendet, der anstelle eines retroviralen Hüllproteins für das virale Hüllprotein des Foamyvirus (*primate/prototyp foamy virus*) kodiert. Das Verwenden des Hüllproteins zur Pseudotypisierung der Viruspartikel bietet im Gegensatz zu lentiviralen Hüllproteinen den Vorteil, dass es aufgrund der Größe des Foamyvirus-Genoms von 13 kb eine potenziell hohe Kapazität besitzt, große heterologe Gensequenzen zu verpacken. Desweiteren scheinen Foamyviren keine Pathogenität bei Menschen zu verursachen (Linial, 2000; Yee et al., 1994) und besitzen einen breiten Wirts- und Gewebetropismus (Meiering and Linial, 2001).

In dieser Arbeit wurden für die Produktion virushaltiger Überstände ein Vektorplasmid, ein Helferplasmid und ein Hüllplasmid verwendet.

Überexpression verschiedener Komponenten des Notch-Signalwegs. Für die Überexpressions-/Expressions-Studien wurde als Transfervektor das Vektorplasmid *pCL6-IEG-wo* verwendet, welches uns freundlicherweise von Prof. H. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie & -Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. Das Vektorplasmid *pCL6-IEG-wo* basiert auf dem zur

Familie der Retroviren gehörendem Lentivirus HIV (humanes immundefizienz Virus). Die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* wurden entfernt und auf das Helferplasmid und das Hüllplasmid verteilt. Das Plasmid enthält eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) und *eGFP* (*enhanced Green Fluorescent Protein*) als Reportergen, die unter der Kontrolle des SFFV-Promoters, stammend aus dem *Spleen Focus Formin Virus* (SFFV), stehen. Im Vektor enthalten sind zudem das Verpackungssignal Ψ , welches notwendig ist, um die Inkorporierung viraler mRNA in den neu gebildeten viralen Partikeln zu ermöglichen sowie die für die Integration in das Genom der Zielzelle nötigen LTRs (*long terminal repeats*) des Virus (Abb. 6A).

Die Plasmide, die strukturelle Komponenten für den Viruspartikel bereitstellen, werden als Helferplasmide bezeichnet. Der als Helferplasmid verwendete Vektor *pCD/NL-BH* kodiert für die retroviralen Strukturgene *gag* (kodierend für die strukturellen Komponenten des Virus: Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine) und *pol* (kodierend für die Enzyme des Virus: Protease, Integrase und reverse Transkriptase). Die regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und *tat* werden unter der Kontrolle des CMV-Promoters reguliert (Mochizuki et al., 1998) (Abb. 6B).

Der als Hüllplasmid verwendete Vektor *pcoPE01* kodiert das foamyvirale (*primate/prototyp foamy virus*) Hüllprotein, dessen Expression ebenfalls vom CMV-Promoter reguliert wird (Heinkelein et al., 1998) (Abb. 6C).

Die durch Helfer- und Hüllplasmid bereitgestellten Sequenzen für die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für die jeweilige virale mRNA. Diese kann jedoch nicht in die viralen Partikel inkorporiert werden, da ihnen das Verpackungssignal fehlt. Somit wird sichergestellt, dass die hergestellten Viren nicht zur Replikation fähig sind, da die Sequenzen für die Strukturproteine des Virus nicht in das Genom der Zielzelle gelangen können. Eine gleichzeitige Transfektion mit den drei beschriebenen Plasmiden führt zu einer Generierung von effizienten rekombinanten, replikationsdefekten Retroviren (Naviaux et al., 1996; Soneoka et al., 1995).

Bei den verwendeten retroviralen Plasmiden ist der Promotor- und Enhancer-Bereich im 3`LTR deletiert, weshalb sie zu den selbst-inaktivierenden (*self-inactivating/SIN*) Vektoren gehören. Durch die Integration in das Genom der Zielzelle wird der defekte

U3-Bereich des LTRs auf den U3-Bereich der 5`LTRs geschrieben: beide LTRs des Provirus sind somit transkriptionell stumm.

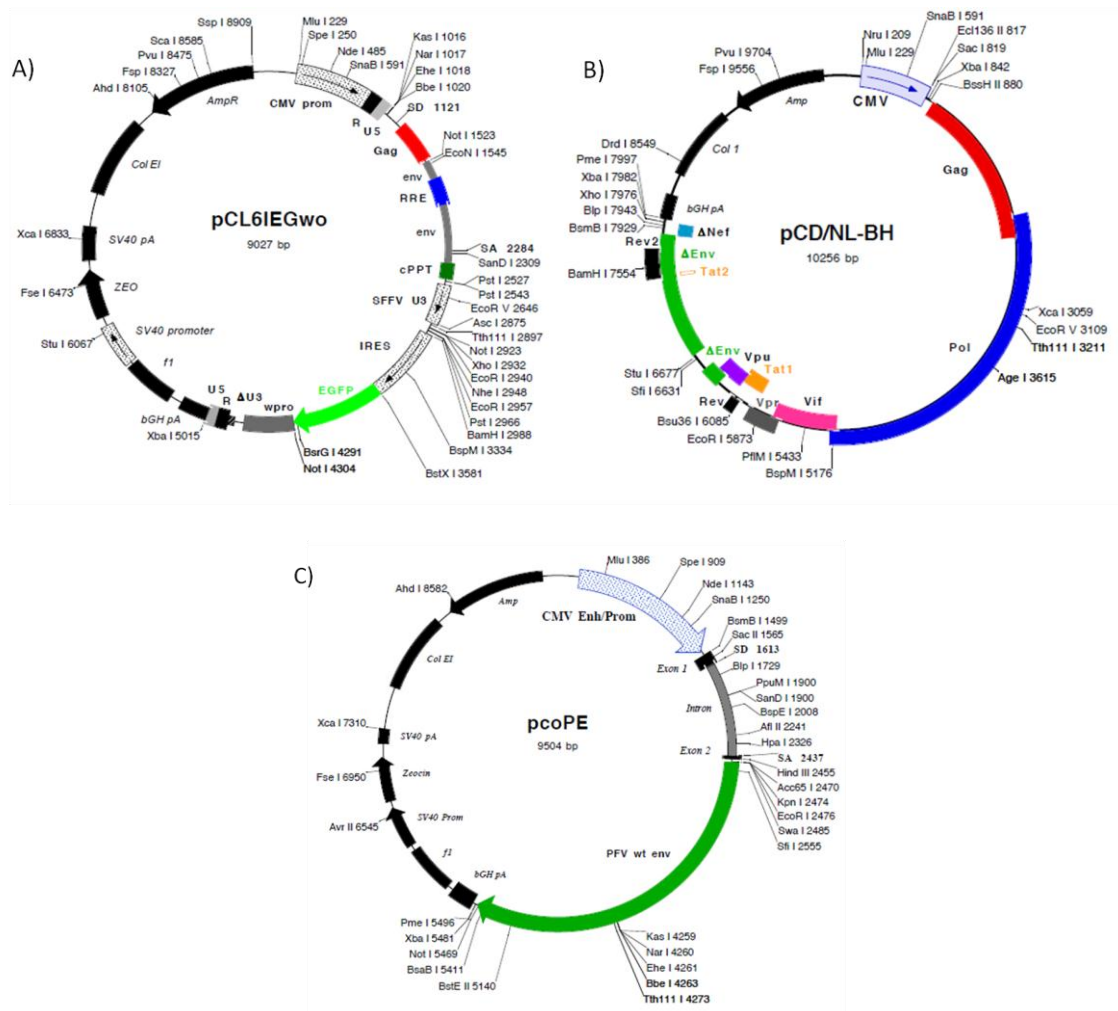


Abb. 6 : Karten der verwendeten Plasmide

(A) Als Transfervektor wurde das Plasmid pCL6-IEGwo verwendet; **(B)** Als Helferplasmid wurde der Vektor pCD/NL-BH verwendet; **(C)** Als Hüllplasmid der Vektor pcoPE.

In dieser Arbeit wurden die folgenden in unserer Arbeitsgruppe bereits bestehenden Transferplasmide zur Herstellung virushaltiger Überstände verwendet: *pCL6-IEG-wo-Numb1*, *pCL6-IEG-wo-Numb2*, *pCL6-IEG-wo-Numb3*, *pCL6-IEG-wo-Numb4*, *pCL6-IEG-wo-Numblike*, *pCL6-IEG-wo-MAML1(1-302)*, *pCL1-IEG-wo-NICD1*, *pCL6-IEG-wo-Hey1*, *pCL6-IEG-wo-Hey2*, *pCL6-IEG-wo-Hes1*.

Diese wurden ursprünglich wie folgt kloniert:

Die Plasmide, die die verschiedenen Numb-Isoformen enthielten, wurden ursprünglich von Verdi et al. (Verdi et al., 1999) zur Verfügung gestellt. Alle vier für die verschiedenen Numb-Isoformen kodierenden Regionen [Numb1 (1956 bp), Numb2 (1812 bp), Numb3 (1923 bp) und Numb4 (1779 bp)] wurden durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* aus dem Expressionsvektor pIRES-eGFP ausgeschnitten und anschließend in den entsprechend mit *EcoRI* und *XhoI* behandelten Transfervektor pCL6-IEG-wo ligiert. Das 906 bp große cDNA-Fragment, das für humanes MAML1(1-302) kodiert, wurde aus dem Expressionsvektor pFLAG-CMV2 (erhalten von Lizi Wu, (Wu et al., 2000)) über *Sall* und *BamHI* ausgeschnitten und über die Schnittstelle *XhoI* und *BamHI* in den pCL6-IEG-wo ligiert. Das 2400 bp große cDNA-Fragment, kodierend für die humane intrazelluläre Domäne von Notch1, wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XhoI* aus dem pCDNA3.1-Vektor (Invitrogen) ausgeschnitten und anschließend in den entsprechend mit *BglII* und *XhoI* geöffneten Transfervektor pCL6-IEGwo ligiert. Für die Klonierung von Numblike, Hey1, Hey2 und Hes1 wurden zunächst aus unterschiedlichen Zellen (humanen umbilikalen Venenendothelzellen sowie endothelialen koloniebildenden Zellen) cDNA-Banken erstellt. Aus diesen wurden mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR die offenen Leseraster von Numblike, Hey1, Hey2 und Hes1 amplifiziert. Nach der Amplifikation fand ein Restriktionsverdau der PCR-Produkte statt, so dass spezifische 3'-Überhänge an den Sequenzenden generiert wurden. Mittels dieser 3'-Überhänge wurden die PCR-Produkte vorerst in den Expressionsvektor pIRES-eGFP eingebracht. Hierbei wurden die Amplifikate der offenen Leseraster für Numblike (1830 bp), Hey1 (915 bp) und Hes1 (843 bp) jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* verdaut und anschließend in den entsprechend mit *XhoI* und *BamHI* behandelten Vektor pIRES-eGFP ligiert. Das 1014 bp große Amplifikat des offenen Leserasters Hey2 wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BglII* ausgeschnitten und anschließend in den entsprechend mit *XhoI* und *BamHI* behandelten Transfervektor pIRES-eGFP ligiert, da die Überhänge der *BglII* und *BamHI* kompatibel sind.

Anschließend wurden die Fragmente von Numblike, Hey1, Hey2 und Hes1 jeweils mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BsrGI* aus dem Vektor pIRES-eGFP ausgeschnitten und in den Vektor pCL6-IEG-wo, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geöffnet wurde, ligiert.

Herunterregulation der Genexpression von Numb und Numblike. Zur Herunterregulation der Genexpression von Numb und Numblike wurde neben dem als Helferplasmid verwendeten Vektor *pCD/NL-BH* und dem als Hüllplasmid verwendeten Vektor *pcoPE01* der von Open Biosystems entwickelte *pTRIPZ-shRNAmir* Vektor als Vektorplasmid verwendet (Abb. 7) (Das et al., 2004; Silva et al., 2005). Durch den Vektor *pTRIPZ-shRNAmir* werden permanent kurze Haarnadel-RNAs (*short hairpin RNAs/shRNA*) produziert (Paddison et al., 2004). Der Vektor ist mit einem Tet-on®-System ausgestattet, mit dessen Hilfe die Induktion der Genexpression durch die Zugabe von Doxzyklin reguliert werden kann. Diese Doxzyklin-abhängige Induktion wird durch zwei Komponenten im *pTRIPZ* Vektor ermöglicht: dem *tetracyclin response element (TRE)* und dem reversen Tetrazyklin abhängigen Transaktivator 3 (*rtTA3*). Der *rtTA3* kann Tetrazyklin bzw. dessen Derivat Doxzyklin binden. Der gebildete Komplex aus Doxzyklin und *rtTA3* aktiviert den *TRE* Promoter des Zielgens. Zusätzlich wird zu der Expression der *shRNAmir* das Reporterprotein *tRFP (turbo Red Fluorescent Protein)* exprimiert. Das Tet-on®-System kann durch Entzug des Induktors Doxzyklin wieder deaktiviert werden. In dieser Arbeit wurden die in unserer Arbeitsgruppe bereits bestehenden *pTRIPZ-shRNAmir-Numb* [freundlicherweise von Prof. Dr. med. N. Stöcklein (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt] und *pEGIPZ-shRNAmir-Numblike* Konstrukte verwendet. Bei dem *pEGIPZ-shRNAmir-Numblike* Konstrukt wurde die kodierende Region für tRFP im *pTRIPZ-shRNAmir* gegen die kodierende Region von eGFP mittels der Oligonukleotide eGFP *Cloning fwd* (5'- TCA ACA ACC GGT GCC ACC ATG GTG AGC A-3') und eGFP *Cloning rev* (5'- ACA TAG ATC GAT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG-3') aus dem Plasmid pEGFP-N1 amplifiziert. Durch die Verwendung der Oligonukleotide wurde eine Kosak-Sequenz vor dem amplifizierten eGFP sowie die Schnittstellen *AgeI* und *Clal* eingeführt. Die kodierende Region des tRFP wurde durch

enthaltendem Puffer homogenisiert und lysiert. Durch das Salz Guanidiniumisothiocyanat werden sämtliche Proteine inklusive RNasen denaturiert und die RNA vor Degradierung bewahrt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung der RNA mit mehr als 200 Nukleotiden an die Siliziumdioxidmembran, während Zellbestandteile abgewaschen werden. DNA-Reste wurden durch eine Behandlung mit DNase entfernt. Anschließend wurde die RNA mit 40 µl nukleasefreiem Wasser von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen endothelialen Vorläuferzellen erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls. Die hierbei verwendeten Qiagen-Anionenaustauscher-Säulen des RNeasy Micro Kits wurden speziell für die Isolierung von RNA aus wenig Ausgangsmaterial ($\leq 5 \times 10^5$ Zellen) entwickelt.

2.2.1.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels Spektralphotometer (NanoDrop 1000 Spektralphotometer, Peqlab) bestimmt. Für die Messung wurde 1 µl eluierte RNA gegen nukleasefreies Wasser gemessen. Purin- und Pyrimidinbasen besitzen bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Absorptionsmaximum, weshalb die Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben auf dem NanoDrop 1000 bei 260 nm erfolgte. Um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt und der Quotient E260/E280 gebildet, der bei proteinfreier RNA-Präparation zwischen 1,8-2,0 liegt.

2.2.1.2.3 Reverse Transkription-Reaktion zur Synthese von cDNA (RT)

Das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgt durch Enzyme, die als reverse Transkriptasen oder RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet werden. Das Umschreiben von cDNA aus RNA erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, Kalifornien, USA) gemäß den

Angaben des Herstellerprotokolls. Zuerst wurde ein zweifacher RT Master-Mix vorbereitet, welcher folgende Komponenten pro Ansatz enthielt:

2x RT-Master-Mix:

2 µl 10x RT Puffer

0,8 µl 25x dNTP Mix (100 nM)

2 µl 10x RT Random Primer

1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase

4,2 µl nukleasefreies Wasser

Da in der anschließenden quantitativen Echtzeit-PCR (*Real Time-quantitative Polymerase-Chain Reaction/qRT-PCR*) der Nachweis verschiedener cDNAs erfolgen sollte, wurde die komplette mRNA durch die Verwendung von einem Gemisch aus Hexamernukleotiden unterschiedlicher Sequenz in cDNA umgeschrieben. Es wurden je Ansatz 10 µl zweifach RT-Stocklösung mit 10 µl der RNA-Probe vermischt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne reverse Transkriptase (-RT) angesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Thermocycler für 10 min bei 25 °C und 120 min bei 37 °C. Zur Denaturierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 5 min bei 85 °C inkubiert.

Die cDNA-Probe wurde mit 150 µl DNase freiem Wasser (Sigma) verdünnt, damit verbleibende RT-Bestandteile die nun folgende qRT-PCR nicht beeinträchtigten.

2.2.1.2.4 TaqMan qRT-PCR

Die TaqMan Technologie basiert auf der RT-PCR Methode, bei der die Markierung des PCR-Produkts durch ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid erfolgt, welches spezifisch an die entsprechende komplementäre Zielsequenz bindet. An diese Gensonde ist neben dem Reporterfarbstoff zusätzlich ein Fluoreszenz lösches Molekül (*Quencher*) gebunden. Solange die Sonde intakt ist, wird die Energie des angeregten Fluorophors (*Reporter*) zu dem benachbarten Chromophor (*Quencher*) transferiert, ohne dass dabei Strahlung abgegeben wird (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer/FRET). Während der PCR bindet die Sonde zwischen dem 5'- und 3'-Primer und wird bei der cDNA Synthese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten

Taq-DNA-Polymerase abgebaut. Durch die daraus resultierende Trennung von *Reporter* und *Quencher* strahlt der von außen angeregte Reporterfarbstoff ein detektierbares Fluoreszenzsignal aus, welches nach jedem PCR Zyklus (*real-time*) gemessen wird. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Die in diesen Versuchen verwendete Stocklösung enthielt neben der *Ampli Taq Gold DNA-Polymerase* für die Taqman qRT-PCR optimierte Pufferkomponenten und den Farbstoff ROX (X-Rhodamin), der als passive Referenz zur Berechnung der Fluoreszenz dient. Ebenfalls enthielt der Mastermix das Enzym *Uracil-N-Glycosylase (AmpErase UNG)* welches DNA-Stränge abbaut, die Uracil anstelle von Thymin enthalten und verhindert somit eine Reamplifizierung von kontaminierten PCR Produkten.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

10 µl 2x Master-Mix (Eurogentec, Ref. RT_QP2-03-15t)

1 µl der jeweiligen qPCR Sonde

9 µl cDNA

20 µl Reaktionsansatz

Alle verwendeten Sonden für die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen und sind in Tab. 2 dargestellt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, welche anstelle der cDNA Wasser enthält [„no template control“ (NTC)].

Tab. 2 : Auflistung der verwendeten Taq-Man Sonden der Firma Applied Biosystems

Sonde	Sonden Sequenz (5' → 3')	Lokalisation [bp]	Amplikon Größe [bp]
Numb	tcgca cggaaaaatg tagcttccc gtttaagtacc ttggccatgt agaagttgat gaatcaagag gaatgcacat ctgt	446	79
NumbLike	c gctggatctg ccactgtttt ctggcactga aggactccgg cgagaggctg agccacgctg tgggctgtgc ttttccgcc t	712	82
Hey1	ccatcgag gtggagaagg agagtgcgga cgagaatgga aacttgagtt cggctctagg ttccatgt	286	66
Hes1	gtgaagcac ctccggaacc tgcagcgggc gcagatgacg gctgcgctga gcacagaccc aagtgtgctg ggggaagtac	532	78
GAPDH	cgctcagaca ccatggggaa ggtgaaggtc ggagtcacg gatttggtcg tattggcgc ctggtcacca gggctgcttt taactctggt aaagtggata ttgttccat caatgacccc tt	157	122

Die qRT-PCR wurde benutzt, um nach vorheriger reverser Transkription die relative Menge eines bestimmten Transkripts in der Probe nachzuweisen. Dazu wurde die

sogenannte komperative Ct-Methode (auch $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) angewandt. Hierbei wurde von jeder Probe jeweils für das Transkript von Interesse und der internen Referenz GAPDH ein doppelter Ansatz angesetzt. Verwendet wurde der „ABI PRISM 7900HT Sequence Detectors“ (Applied Biosystems) mit folgender Einstellung: 2 min bei 50 °C zur Inkubation der *UNG AmpErase*, Aktivierung der *Ampli Taq Gold DNA Polymerase* für 10 min bei 95 °C gefolgt von der PCR (40 Zyklen): Denaturierung für 15 sec bei 95 °C und *Annealing/Elongation* für 1 min bei 60 °C.

Nach vollendetem Lauf stellte die Auswertesoftware (Sequence Detector Software SDS 2.2, Applied Biosystems) die gemessenen Fluoreszenzwerte in einem Graphen gegen die Zyklenanzahl dar. Es wurde ein Schwellenwert (Ct) gesetzt, der die Kurven der Amplifikationen im frühen exponentiellen Bereich markiert. Die Zellzykluszahl, bei der eine Kurve die Ct -Linie schneidet, ergab den Ct -Wert für den entsprechenden Probenansatz. Aus den Ct -Werten der Zielsequenz (Ct_t) und der internen Referenz (Ct_R) wurde anschließend der ΔCt -Wert wie folgt gebildet: $\text{Ct}_t - \text{Ct}_R = \Delta\text{Ct}$

Dieser wurde von dem ΔCt -Wert des Kalibrators, hier einer unbehandelten Kontrolle, die als Standard zur Angabe der relativen Template-Menge im Ansatz verwendet wurde, subtrahiert: $\Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibratorprobe}} = \Delta\Delta\text{Ct}$

Anhand der Formel $N_t = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ wurde die Expressionsänderung bezogen zur Kalibratorprobe, die den Wert 1 erhält, berechnet und grafisch dargestellt. Der Wert N_t stellt hierbei die Menge der Zielsequenz normalisiert zu einer endogenen Referenz und relativ zum Kalibrator dar.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt. Alle Medien enthielten zur pH-Kontrolle Phenolrot (pKs= 7,4).

- *Hek293T-Medium*: Ansatz für 100 ml Medium: 90 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; 4,5 g/l Glukose; PAA, Pasching, Österreich), 10 ml fötales Rinderserum (FBS; Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 100 U/ml L-Glutamin (Gibco) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco).

- *EGM-2*: Zur Kultivierung von humanen endothelialen Vorläuferzellen wurde das kommerziell erwerbliche Medium EBM-2 (*Endothelial Basal Medium*; Lonza, Köln, Deutschland) mit den Zusätzen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Lonza), hFGF (*human Fibroblast Growth Factor*) (Lonza), R-IGF-1 (*recombinant Insulin Growth Factor-1*) (Lonza), hEGF (*human Epidermal Growth Factor*) (Lonza), Ascorbinsäure (Lonza), Hydrocortison (Lonza), Heparin (Lonza) und 2 % FBS (Lonza) verwendet. Ebenfalls wurde das Medium mit dem Antibiotikum Gentamycin (Lonza) und dem Antimykotikum Amphotericin B (Lonza) versetzt. Die Konzentrationsangabe der einzelnen Komponenten wird von der Firma Lonza nicht angegeben.

- *Generierung von humanem Plättchenlysät (PL)*: Für die Generierung von humanem PL wurden leukozytendepletierte, bestrahlte Apherese-Thrombozytenkonzentrate nach Ablauf der Lagerungsfrist von höchstens vier Tagen nach Spende verwendet. Zur Lysierung der Plättchen wurden diese bei -20 °C eingefroren. Zur Entfernung der Membranfragmente wurde das PL anschließend zentrifugiert (5000 x g, 1 h). Individuelle Abweichungen der Proben wurden durch ein Vermischen von über 80 verschiedenen Thrombozytenkonzentraten ausgeglichen. Die zusammengeführten PL wurden in 50 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

- *EBM-2 + humanes Plättchenlysät*: Hierbei wurde das beschriebene EGM-2 Medium (Lonza) verwendet, aber 5 % PL statt FBS eingesetzt. Um eine Gerinnung des Mediums durch die in den Plättchen enthaltenden gerinnungsfördernden Stoffe zu verhindern, wurden 100 µl Heparin (Heparin-Natrium-5000, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) je 500 ml EBM-2 Medium hinzugefügt.

2.2.2.2 Plastikware

Alle Gewebekulturschalen/-flaschen aus Polystyrol (TCPS) sowie das Advanced TC™ (A-TCPS) wurden von der Firma Greiner BioOne GmbH (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Die Polymermodifikation des A-TCPS verändert die Oberfläche der Zellkulturgefäße derart, dass anspruchsvolle Zellen besser kultiviert und ihre funktionellen Eigenschaften positiv beeinflusst werden. Genauere Angaben zu der Art der Modifikation werden von Greiner BioOne nicht angegeben.

2.2.2.3 Extrazelluläre Matrixkomponenten (EZM)

Die TCPS-Kulturgefäße wurde mit den folgenden sechs Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet: Kollagen Typ I (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), 0,1 % Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 50 µg/ml Hyaluronsäure (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml Laminin aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkom (Sigma-Aldrich) und 500 IE Heparin Natrium (Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Zur Beschichtung wurden je Vertiefung einer 24-Well Platte 350 µl der sich in Suspensionslösung befindenden extrazellulären Matrixkomponenten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei RT wurde die Suspensionslösung entfernt, so dass eine dünne Beschichtung zurückblieb. Zusätzlich wurde Fibrin nach Neuss *et al.* verwendet (Neuss et al., 2010): Eine Fibrinlösung, bestehend aus 170 µl einer sterilen Fibrinogenlösung [50 µl CaCl₂ (50 mM, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland)] und 120 µl GBSH Puffer, wurden mit 830 µl Fibrinogen (20 mg/ml, Sigma-Aldrich) und 20 µl Thrombin (10 U/ml, Sigma-Aldrich) vermischt und für 30 sec auf das zu beschichtende TCPS gegeben. Das Fibrin wurde vor Polymerisierung entfernt, so dass eine dünne Schicht auf der TCPS-Oberfläche zurückblieb.

2.2.2.4 Kultivierung von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurden diese mit *Phosphate buffered Saline* (PBS, Gibco) gewaschen und dann mit 1x Trypsin/PBS-Lösung abgelöst. Zum Abstoppen des Trypsins wurden die Zellen in ein geeignetes Reaktionsgefäß mit dem für die Zellen entsprechendem Medium überführt. Die Zellen wurden bei RT und 900 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 3,75 ml Kulturmedium resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension 1:1 mit Einfriermedium [60 % Kulturmedium, 20 % DMSO (CryoSure-DMSO, WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland) und 20 % FBS (Lonza)] vermischt. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml Aliquots in 1,8 ml Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml vorgewärmten Kulturmedium (37 °C) überführt. Die Zellen wurden bei RT und 900 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Niederschlag in entsprechender Menge vorgewärmten Kulturmedium (37 °C) resuspendiert und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt.

2.2.2.5 HEK293T-Zellen

Die Zelllinie HEK293 ist Anfang der 1970er von Alex Van der Eb aus humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney*), durch Transformation mit 4,5 kb gescherter DNA des menschlichen Adenovirus 5, generiert worden (Graham et al., 1977).

Bei diesen adhärent wachsenden Zellen handelt es sich um hypotriploide Zellen. In der Variante HEK293T wird im Gegensatz zu der Linie HEK293A zusätzlich das „SV40 *large T Antigen*“ exprimiert, wodurch in diesen Zellen die DNA-Replikation episomaler Plasmide ermöglicht wird, die einen SV40-Replikationsursprung enthalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturgefäßen bis zu einer Besiedlung des Kulturgefäßes (Konfluenz) von ca. 80-90 %. Dann wurden die Zellen trypsiniert und in benötigter Konzentration erneut ausplattiert.

2.2.2.6 Primäre endotheliale Vorläuferzellen

2.2.2.6.1 Gewinnung von humanen endothelialen koloniebildenden Vorläuferzellen aus Nabelschnurrestblut

Die in Kultur zu ECFCs auswachsenden Zellen werden nach Größe und Granularität durch eine Dichtegradientenzentrifugation vom Restblut abgetrennt (Ficoll-Lösung, Dichte 1.077 g/ml, Biochrom, Berlin, Deutschland). Restliche Erythrozyten werden über osmotischen Lyse (Lysepuffer, BD Biosystems, Heidelberg, Deutschland) (7 min/4 °C) entfernt. Nach folgenden Waschschritten mit PBS (900 x g/5 min) werden die isolierten Zellen gezählt und jeweils 2×10^6 Zellen pro Vertiefung auf 6-Well Platten, welche mit Kollagen beschichtet wurden, in 3 ml endothelspezifischem Medium (EGM-2) ausgesät. Nach 24 h werden alle nicht adhärenenten Zellen abgenommen, die Vertiefungen mit PBS gespült und mit 3 ml frischem EGM-2 aufgefüllt. Bei 60 % der verwendeten Nabelschnurrestblute konnten nach 10-14 Tagen endotheliale Kolonien detektiert werden. Aufgrund ihrer koloniebildenden Eigenschaft werden diese Zellen endotheliale koloniebildende Zellen (*endothelial colony forming cells/ECFCs*) genannt (Ingram et al., 2004).

2.2.2.6.2 Gewinnung von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen

Humane umbilikale Venenendothelzellen (*human umbilical endothelial cells/HUVECs*) wurden aus der Gefäßwand einer Nabelschnurvene innerhalb von 24 h nach der Geburt des Kindes isoliert. Hierbei wurden nach zweimaligem Spülen der Vene, um restliches Blut zu entfernen, die HUVECs durch einen 20 min enzymatischen Verdau (1x Trypsinlösung, Gibco) bei 37 °C aus der Venenwand gelöst und durch anschließendes Durchspülen der Vene mit EGM-2 in einem separaten Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Zellen wurden bei 900 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend in ein Zellkulturgefäß überführt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode der Zellanalyse dar, bei der zelluläre Bestandteile komplexer Zellgemische auf Einzelzellbasis untersucht werden können. Die Einzelerfassung erfolgt hierbei mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen aus einem Probenröhrchen in einer dünnen Flüssigkeitssäule eingeschlossen, in ein zweites Flüssigkeitssystem eingeleitet, welches in Form einer großen Flüssigkeitssäule die kleinere Flüssigkeitssäule mit den darin eingeschlossenen Zellen umhüllt. Diese „Hüllflüssigkeit“ (sheath fluid) weist eine im Vergleich zur kleinen Flüssigkeitssäule höhere Fließgeschwindigkeit auf, wodurch eine Vereinzelung und Fokussierung der Zellen im Zentrum des Flüssigkeitsstrahls erzielt wird (Hydrodynamische Fokussierung). Jede im Flüssigkeitszylinder eingeschlossene Zelle wird anschließend in einem sogenannten Laser-Intersect vom Licht eines bei 488 nm emittierenden Argon-Lasers angestrahlt, wobei jede Zelle ein zelltypcharakteristisches Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)- Streulicht erzeugt sowie darüber hinaus zur Emission spezifischer Fluoreszenzlichtcharakteristika angeregt wird. Der FSC wird als Maß der Zellgröße detektiert, Farbteilerspigel und Filter trennen der SSC als Maß der Granularität der Zelle und der Fluoreszenzen. Die spektral unterschiedenen Lichtsignale der Fluoreszenzfarbstoffe können mit Hilfe sogenannter Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier/PMT) detektiert und nach Umwandlung in elektrische Signale quantitativ erfasst werden. Einer üblichen Nomenklatur folgend werden die PMT mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2, FL3). Bei Anregung mit dem 488 nm Laser erkennt beispielsweise der FL1- Detektor grünes Licht, der FL2-Detektor oranges Licht und der FL3-Detektor rotes Licht. Die Verwendung weiterer Laser [z.B. einem roten Laser (633 nm), violetten Laser (407 nm)] erlaubt den Einsatz eines größeren Spektrums von Fluoreszenzfarbstoffen, da mehrere Anregungswellenlängen für die Anregung (Exzitation) von Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt werden können. Je nach Anzahl von Fluorochromen mit ausreichend unterschiedlichen Emissionsspektren und der Laser können mit dem verwendeten Durchflusszytometer gleichzeitig mehrere Fluoreszenzparameter

gemessen werden. Die gemessenen Signale können als Histogramme (Anzahl gegen Parameter) oder als Punktwolkendarstellung in einem Graphen (*Dot-Plot*) abgebildet werden. Hierbei wird auf jeder Achse ein anderer Parameter (FSC, SSC oder ein Fluoreszenzsignal) dargestellt. In einem *Dot-Plot* wird jede einzelne Zelle entsprechend ihren x- und y-Signalintensitäten als einzelner Punkt abgebildet. Einzelne Regionen oder eine Kombination von Regionen können in einem *Dot-Plot* markiert (*gating*) und hinsichtlich ihrer Eigenschaften isoliert betrachtet werden. Hierdurch können einzelne Zellfraktionen und Subpopulationen in heterogenen Zellgemischen gezielt untersucht werden. Für Standardmessungen wurde das Durchflusszytometer Cytomics FC 500 der Firma Beckman Coulter verwendet (Tab. 3), welches mit einem blauen Argon Laser (488nm) und einem roten HeNe Laser (638 nm) ausgestattet ist und gleichzeitig 5 Fluoreszenzen detektieren kann.

Tab. 3 : Übersicht der verwendeten Laser, PMTs und Bandpassfilter des Cytomics FC 500

PMT: Photomultiplier; FL: Aufsteigende Nummerierung der PMT mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht (Nomenklatur); BP: Bandpassfilter

Laser 488 nm		
PMT	BP [nm]	Fluorochrombsp.
FL1	525	Fitc, eGFP
FL2	575	PE
FL3	620	ECD, Ds-Red
Laser 638 nm		
PMT	BP [nm]	Fluorochrombsp.
FL4	655	APC, PCy5, PerCP
FL5	755	PECy7

Zur graphischen Darstellung der erhobenen Messdaten wurde die Software Kaluza 1.1 und CXP 2.2 (Beckman Coulter) verwendet.

2.2.3.2 Durchflusszytometrische Isolation von endothelialen Vorläuferzellen

Verschiedene Populationen endothelialer Vorläuferzellen, welche aufgrund der Oberflächenexpression der Oberflächenproteine CD34 und CD44 in verschiedene Zellfraktionen unterteilbar waren, wurden mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Separationsverfahrens voneinander getrennt. Ebenfalls wurden lentiviral transduzierte eGFP exprimierende Zellen von nicht transduzierten (eGFP negativen) Zellen getrennt.

Für die Separation der einzelnen Zellfraktionen wurde ein FACS Aria I Durchflusszytometer (BD) verwendet (Tab. 4 und Tab. 5). Zur effizienten Separation von endothelialen Vorläuferzellen wurde eine 130 µm *Nozzle* verwendet, bei der ein Probenflüssigkeitsdruck von 10 psi (*poundforce per square inch*) einstellbar ist, da die Vitalität der endothelialen Vorläuferzellen bei einem höheren Probenflüssigkeitsdruck stark beeinträchtigt wird. Nach hydrodynamischer Fokussierung der Zellen wird der die Zellen umhüllende Flüssigkeitsstrahl mittels eines elektrischen Transducers, welcher mit einer Frequenz von 14 kHz betrieben wurde, zu Vertikalschwingungen angeregt, so dass der die Zelle umhüllende Flüssigkeitsstrahl im sogenannten Tropfenabrisspunkt (*last attached drop*) in Tropfen übergeht. Erreicht eine zu separierende Zelle den Tropfenabrisspunkt, so wird der gesamte Flüssigkeitsstrahl für kurze Zeit elektrisch geladen, so dass der sich ablösende Tropfen mit der darin enthaltenden Zelle eine elektrische Restladung trägt. Diese Restladung dient der Deflexion des Tropfens und somit der zu separierenden Zelle in einem elektrischen Feld, welches zwischen 2 Ablenkungsplatten (*deflection plates*) anliegt. Die separierten Zellen wurden anschließend in Probenröhrchen, in denen Medium vorgelegt wurde, aufgefangen. Mit dem Aria I konnten bis zu 4 verschiedene Zellfraktionen zur selben Zeit separiert sowie einzelne Zellen in die Vertiefung von Mikrotiterplatten abgelegt werden.

Tab. 4 : Übersicht der verwendeten Laser, PMTs und Filter des Aria I

PMT: Photomultiplier; BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter

Laser 488 nm			
PMT	BP [nm]	LP [nm]	Fluorochrombsp.
A	780/60	735	PE-Cy7
B	695/40	685	PE-Cy5, PE-Cy5.5, PerCP
C	610/20	595	ECD, Ds-Red
D	576/26	550	PE
E	530/30	505	Fitc, eGFP
F	488/10		SSC
G			
Laser 633 nm			
PMT	BP [nm]	LP [nm]	Fluorochrombsp.
A	780/60	735	APC-Cy7
B	660/20		APC, Cy5
Laser 407 nm			
PMT	BP [nm]	LP [nm]	Fluorochrombsp.
A	530/30	502	Fitc, eGFP
B	450/40		Hoechst, DAPI

Tab. 5 : Verwendete Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers Aria I

Parameter	Justierung
Nozzle-Öffnung	130 µm
Flussrate (Zellen/sec)	500-1000
Probenflüssigkeitsdruck (psi)	10
Transducer-Frequenz (kHz)	14
Amplitude	10-12
Drop one	200-220
Gap	14
Drop-Delay	19,75

Vor der Separation der endothelialen Vorläuferzellen erfolgte die Justierung des Tropfenabrisspunktes durch die experimentelle Separation fluoreszierender Kalibrierungsbeads (BD FACS Accudrop Beads, BD), bis eine Separationsreinheit von $\geq 99\%$ erreicht wurde. Die Kalibrierung des optischen Systems erfolgte mittels standardisierter Kalibrierungsbeads (BD Cytometer Setup & Tracking Beads, BD). Als Trägerlösung wurde steriles PBS (PAA) verwendet. Zur Entfernung von Zellaggregaten wurden vor jeder Separation die sich in Suspension befindenden endothelialen

Vorläuferzellen durch einen sterilen Filter (35 µm; BD) gepresst. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde durch eine Reanalyse der separierten Zellen überprüft. Die erhobenen Daten der Zellseparationsprozedur wurden computergestützt gespeichert und die Software Diva 6.1.2 (BD) für graphische Darstellungen verwendet.

2.2.4 Herstellung virushaltiger Überstände

Je herzustellendem virushaltigem Überstand wurden zwei T175 Zellkulturflaschen mit HEK293T Zellen in einer Dichte von jeweils 6×10^6 Zellen ausgesät und für einen Tag inkubiert. Die Herstellung virushaltiger Überstände erfolgte durch eine gleichzeitige Transfektion mit den unter 2.2.1.1 beschriebenen Plasmiden in HEK293T Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI). Soweit nicht anders beschrieben, wurden für Transfektionen von HEK293T Zellen in T175 Zellkulturgefäßen 75 µl einer 1 mg/ml konzentrierten PEI-Lösung verwendet. Von dem Transferplasmid, dem Helferplasmid und dem Hüllplasmid wurden jeweils 12 µg DNA pro T175 Zellkulturflasche eingesetzt. Die Transfektanten wurden über Nacht unter Einfluss der Transfektionslösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der PEI-Nukleinsäure-Komplex wird von Zellen endozytiert, wodurch die DNA ins Zellinnere gelangt (Boussif et al., 1995; Goula et al., 1998). Nach einer Inkubation von 12-18 h wurde das Medium gegen natriumbutyrythaltiges (Buttersäure Natriumsalz, Merck) HEK293-Medium (DMEM, 10% FBS, Natriumbutyrat 10 mM) ausgetauscht. Durch das Natriumbutyrat wird der CMV-Promoter der Plasmide aktiviert, wodurch ein bis zu zwölfmal höherer Virustiter erreicht werden kann (Leurs et al., 2003; Radsak et al., 1989; Tanaka et al., 1991). Nach 6-8 h wurde das Induktionsmedium abgenommen und durch frisches HEK293-Medium ersetzt. Nach weiterer Inkubation der Ansätze für 18-22 h wurde der Überstand mit einer Spritze abgenommen, steril filtriert (Minisart Filter 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und in aerosoldichte Polycarbonat-Zentrifugationsröhrchen (50 ml *Oak Ridge tube*, Nalgene, Rochester, New York, USA) überführt. Durch Zentrifugation der Überstände bei 26.000 x g für 90 min bei 4 °C wurde der Virus niedergeschlagen. Der Überstand wurde komplett abgenommen und der Virusniederschlag in 5 ml entsprechendem Medium für die Zielzellen (in diesem Fall EGM-2) resuspendiert und

anschließend in 100-200 µl aliquotiert. Das virushaltige Medium wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Transduktion endothelialer Vorläuferzellen durch lentivirale Vektoren

Die Transduktion humaner endothelialer Vorläuferzellen wurde in 9,6 cm² Zellkulturschalen (*6-well tissue culture plate*, Greiner bio-one) bei einer Besiedlung des Kulturgefäßes (Konfluenz) von 25 % in 3 ml EGM-2 durchgeführt. Hierbei wurde je nach virushaltigem Überstand zwischen 75 und 200 µl des virushaltigen Überstandes auf die zu transduzierenden Zellen in das Medium hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10 h wurde das virushaltige Medium abgenommen und durch frisches EGM-2 ersetzt.

Zur Beurteilung der Transduktionseffizienz wurde die Fluoreszenz des eGFP-Reporterproteins bei den mit den pCL6-IEGwo Vektor transduzierten Zellen 24 h nach Transduktion mikroskopisch betrachtet. Nach 48-72 h wurde der Anteil eGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Angestrebt wurde eine Transduktionseffizienz von 30-50 %, da hierdurch während der weiteren Kultivierung der Zellen ein selektiver Wachstumsvor bzw. -nachteil nachvollzogen werden konnte sowie das Risiko multipler Insertionen reduziert werden konnte.

Die mit den lentiviralen shRNA-Vektoren transduzierten Zellen wurden vorerst ohne Zugabe von Doxzyklin kultiviert und expandiert. Bei einer Zelldichte von 70-80 % einer 175 cm² Zellkulturflasche (Greiner) wurde durch die Zugabe von Doxzyklin die Herunterregulierung von Numb und Numblike induziert. Nach 48-72 h wurde der Anteil tRFP/eGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.6 Funktionelle Analysen von endothelialen Vorläuferzellen

Zur Untersuchung verschiedener Zellqualitäten innerhalb einer Population endothelialer Vorläuferzellen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene funktionelle Auswertungssysteme verwendet, welche im Folgenden dargestellt werden:

2.2.6.1 Aufnahme von AcLDL

Als ein Charakteristikum endothelialer Zellen gilt die Aufnahme von acetyliertem *low-density* Lipoprotein (AcLDL) (Invitrogen). Nach der Internalisierung des AcLDLs dissoziiert es von seinem Rezeptor und findet sich häufig in den Lysosomen wieder (Havekes et al., 1985). Das für diese Arbeit verwendete Dil AcLDL ist mit dem stark fluoreszierenden lipophilen Farbstoff Dil (1,1'-Diocadecyl-3,3,3', 3'-Tetramethylindocarbocyanine) markiert, entsprechend erfolgte der Nachweis der Aufnahme in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch (Zeiss). Für die Färbung von ECFCs wurden diese mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml DIL AcLDL in EGM-2 für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nicht endozytiertes AcLDL wurde durch zweifaches Waschen mit Medium von den Zellen entfernt.

2.2.6.2 Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel

Die Bildung tubulärartiger verzweigter Strukturen im Matrigel gibt erste Erkenntnisse, ob eine bestimmte Fraktion endothelialer Zellen das Potential besitzt, *in vitro* angiogenetisch aktiv zu sein (Ponce, 2009). Das Matrigel wird aus einem mit extrazellulären Matrixproteinen angereicherten Tumor, dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkom, extrahiert (Kleinman et al., 1982). In dieser Arbeit wurde das BD Matrigel™ verwendet, welches neben den extrazellulären Matrixproteinen Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan auch Wachstumsfaktoren (0-0,1 pg/ml bFGF; 0,5-1,3 ng/ml EGF; 15,6 pg/ml IGF-1; 12 pg/ml PDGF und 2,3 ng/ml TGF-β) enthält. Ebenfalls wurde das sogenannte wachstumssfaktorreduzierte Matrigel verwendet, welches ebenfalls aus dem EHS gewonnen wird, in welchem die enthaltenen Wachstumsfaktoren auf ein mögliches Minimum reduziert sind (0-0,1 pg/ml bFGF; < 0,5 ng/ml EGF; 5 pg/ml IGF-1; < 5 pg/ml PDGF und 1,7 ng/ml TGF-β).

Pro Vertiefung einer 96-Well Platte wurden 90 µl Matrigel luftblasenfrei aufgetragen. Das Matrigel wurde zur vollständigen Verfestigung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 40.000 endotheliale Vorläuferzellen in 90 µl EGM-2 Medium resuspendiert und gleichmäßig auf dem Matrigel verteilt. Die Zellen auf dem Gel

wurden anschließend ÜN bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 15 h wurde die Bildung tubulärartiger verzweigter Strukturen mikroskopisch bei 50-facher Vergrößerung (Phasenkontrast) dokumentiert. Die Auswertung der erstellten Bilder erfolgte aufgrund fehlender Software retrospektiv durch die Firma Wimasis Image Analysis (Wimasis GmbH, München, Deutschland). Mit Hilfe von Algorithmen für die quantitative Bildanalyse wurde die Anzahl der ausgebildeten tubulärartigen Strukturen (*tubes*), die Anzahl der Verzweigungspunkte (*branching points*) des gebildeten Netzwerkes und die Anzahl der Schleifenbildung (*loops*) ermittelt.

2.2.6.3 Analysen zur Migration endothelialer Vorläuferzellen

Zur Untersuchung der migratorischen Aktivität sowie der Migrationsgeschwindigkeit verschiedener ECFC-Subpopulationen wurden zuerst die verschiedenen Zellfraktionen durchflusszytometrisch getrennt und jeweils in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte ausplattiert. Nachdem die Zellen adhärent geworden waren (2 h nach Trennung), wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze ein Spalt durch den konfluenten Zelllayer gezogen. Im Lauf der folgenden 15 h wurde die Migration der ECFCs in den entstandenen freien Raum beobachtet. Die Dokumentation des Migrationsverhaltens der ECFCs erfolgte durch Zeitrafferaufnahmen alle 30 min. für 24 h. Die Bewegung (µm) einer Zelle pro Zeitschritt (min) wurde mit der Software des Mikroskops Axio Vision Rel. 4.8 bestimmt. Um eine mittlere Geschwindigkeit der Zelle in µm/min zu ermitteln, wurde die Weglänge durch die Analysedauer geteilt.

2.2.6.4 Koloniebildungspotential endothelialer Vorläuferzellen

Zur Untersuchung des Koloniebildungspotentials von ECFCs/HUVECs wurden je untersuchter Zellfraktion einzelne Zellen durchflusszytometrisch in eine Vertiefung einer 96-Well Platte abgelegt. In jede Vertiefung der 96-Well Platte wurden vor der Einzelzellablage 120 µl EGM-2 Medium vorgelegt. Die einzeln abgelegten Zellen wurden in den 96-Well Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um statistisch Aussagen über das koloniebildende Potential jeder einzelnen Zelle machen zu können, wurden diese nach drei, sieben und vierzehn Tagen analysiert. Hierfür wurde jede

einzelne Vertiefung mikroskopisch betrachtet und die Anzahl der Kolonien sowie deren Koloniegröße dokumentiert. Die Anzahl der Kolonien pro Platte gibt so retrospektiv Rückschlüsse darauf, welches Koloniebildungspotential die jeweilig sortierte Zellfraktion im Mittel hatte.

2.2.6.5 Kumulative Verdopplungsrate endothelialer Vorläuferzellen

Für die Bestimmung der kumulativen Verdopplungsrate einer Zellfraktion wurden bei Versuchsbeginn 5.000 Zellen in eine Vertiefung einer 6-Well Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die adhärenenten Zellen durch Trypsinierung abgelöst, bei 900 x g für 5 min zentrifugiert und ein Aliquot zur Auszählung abgenommen. Nach Zellzahlbestimmung wurden erneut 5.000 Zellen ausplattiert. Der Prozess wiederholte sich, bis die Zellen differenzierten und postmitotisch wurden. Die Berechnung der Zellteilungen erfolgte über folgende Formel:

$$\frac{[\log_{10}(\text{Zellzahl Passagenende}) - \log_{10}(\text{Zellzahl Passagenbeginn})]}{\log_{10}(2)}$$

Die kumulative Verdopplungsrate wurde durch Addition der einzelnen Verdopplungen jeder Passagen berechnet.

2.2.6.6 Nachweis apoptotischer endothelialer Vorläuferzellen

Für den Nachweis der Apoptoserate kultivierter endothelialer Vorläuferzellen wurde die Aktivität der proteolytischen Enzyme Caspase 3 und 7 detektiert, welche in apoptotischen Prozessen involviert sind. Das nicht fluoreszierende Substrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110) wird durch die in apoptotischen Zellen aktivierten Caspasen 3 und 7 zu einem grün fluoreszierendem Substrat gespalten.

Die Zellen wurden lysiert, um die Caspasen ins Medium zu überführen. Hierfür wurden die Zellen zuerst in die Vertiefungen einer 96 Well-Zellkulturplatten ausgesät. Für den Nachweis der Apoptoserate wurde das Apo One Kit (Promega GmbH, Mannheim,

Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte anschließend durch das Fluorometer GENios der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) bei einer Anregungswellenlänge von 498 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist dabei direkt proportional zur Menge aktivierter Caspasen 3 und 7.

2.2.6.7 Nachweis der metabolischen Aktivität von endothelialen Vorläuferzellen

Der Zellmetabolismus wird über die Reduktion des nicht fluoreszenten Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin gemessen. Diese Reduktion findet in den metabolisch aktiven Zellen statt. Vitale Zellen setzen durch ihre metabolische Aktivität Resazurin in den fluoreszenten Farbstoff Resorufin um, sterbende Zellen hingegen erzeugen kein fluoreszentes Signal. Das Resorufin diffundiert anschließend aus der Zelle in das Medium und kann dort gemessen werden.

Die Zellen wurden hierfür zuerst auf 96 Well-Zellkulturplatten in jeweils 100 µl Medium ausgesät. Die Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen erfolgte mit dem CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega GmbH) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Fluoreszenzmessung erfolgte anschließend durch ein Fluorometer (GENios, Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm. Das Fluoreszenzsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

2.2.6.8 Aktivierung von endothelialen Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurden die folgenden Substanzen zur Aktivierung endothelialer Vorläuferzellen verwendet: Histamin, IFN, LPS, TNF- α und VEGF sowie die Zellen einer Hitzebehandlung ausgesetzt wurden. Hierfür wurden je Probenansatz 40.000 Zellen/cm² in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Greiner) ausgesät. Nach 24 h wurden die ersten Zellproben mit IFN (1 µg/ml), LPS (1 µg/ml) und TNF- α (35ng/ml) behandelt und für 15 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die für eine VEGF Behandlung vorgesehene Zellprobe wurde in VEGF-freiem Medium für 24 h vorinkubiert. Die

Behandlung der Zellproben mit VEGF (50ng/ml; Inkubationszeit 60 min) und Histamin (75ng/ml; Inkubationszeit 15 min) erfolgten am nächsten Tag ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellprobe, welche einer Hitzebehandlung unterzogen wurde, wurde für 90 min bei 42,5 °C und anschließend für 60 min bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurde anschließend über die Oberflächenexpression der Oberflächenmarker CD54, CD62E, CD102 und CD106 durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Zellprobe, die ebenfalls zu Beginn in einer Dichte von 40.000 Zellen/cm² ausgesät wurde.

2.2.7 Immunhistochemische Analysen

2.2.7.1 Extrazelluläre Markierung mit fluorchrommarkierten Antikörpern

Die Markierung von Zellen mit direkt fluorchromkonjugierten Antikörpern wurde in Anwesenheit von 5 % (v/v) Eseserum durchgeführt. Für durchflusszytometrische Analysen erfolgte die Färbung der Zellen in Suspension. Die Zellen wurden bei Antikörperfärbungen mit einem der unter Punkt 2.1.3.1. aufgelisteten konjugierten Antikörpern bei einer Verdünnung von 1:25 für 20 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden vor durchflusszytometrischen Messungen und mikroskopischen Analysen nach der Inkubationszeit durch Waschen mit PBS aus dem Färbeansatz entfernt.

2.2.7.2 Intrazelluläre Markierung mit unkonjugierten Antikörpern

Für die Analyse von intrazellulären Proteinen wurden die jeweiligen Epitope für die Antikörper durch Perforieren der Zellmembran zugänglich gemacht. Damit die Form und Struktur der Zellen mit ihren intrazellulären Kompartimenten erhalten blieb, wurden diese zunächst mit einem Fixierungsreagenz fixiert, bevor die Membran permeabilisiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde standardmäßig mit 4 % (v/v) Para-Formaldehyd (PFA) fixiert und mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS permeabilisiert. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die verwendeten

endothelialen Vorläuferzellen in Suspension, für mikroskopische Analysen in adhärentem Zustand gefärbt.

Bei intrazellulären Färbungen der endothelialen Vorläuferzellen für durchflusszytometrische Analysen wurden diese zunächst trypsinisiert. Die benötigte Zellzahl (je eingeplantem Färbeansatz wurden mind. 5×10^4 Zellen eingesetzt) wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit Isoton aufgefüllt und bei $900 \times g$ für 5 min pelletiert. Ein Aliquot dieser Zellen wurde als nicht fixierte Zellkontrolle abgenommen. Die übrigen Zellen wurden mit 4 %igem PFA fixiert und mit 5 % Eseserum für 20 min bei 4°C inkubiert. Verbleibendes PFA wurde entfernt, indem die Suspension mit Isoton auf 15 ml aufgefüllt und bei $900 \times g$ für 5 min pelletiert wurde. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrilles wurde anschließend erneut ein Aliquot als Kontrolle abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden zur Permeabilisierung (40-45 min/RT) in einer 0,1 % Triton-PBS-Lösung (Gibco) resuspendiert. Entsprechend der Anzahl der geplanten Färbungen wurden die Zellen in 50-100 μl Aliquots auf 5 ml Röhrchen aufgeteilt und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden primären Antikörper in entsprechender Konzentration inkubiert (Tab. 6). Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,01 % Triton in PBS entfernt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem der in Tab. 6 aufgelisteten sekundären, fluorochromkonjugierten Antikörper in einem Volumen von 100 μl für 60 min. Anschließend wurde zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers dreimal mit 0,01 % Triton in PBS gespült, die Zellen wurden noch einmal in 1 ml 0,01 % Triton in PBS resuspendiert und 30-60 min unter schwenken gewaschen. Nach einem abschließenden Waschschrill mit 0,01 % Triton in PBS bei $900 \times g$ für 5 min, wurden die Zellen in einem Volumen von 200 μl PBS aufgenommen und standen für durchflusszytometrische Analysen zur Verfügung.

Für Färbungen der endothelialen Vorläuferzellen zur mikroskopischen Analyse wurden die adhärenen Zellen in Kammer-Objektträgern (Thermo Electron LED GmbH; Lab-Tek, Langenselbold, Deutschland) kultiviert. Bei 50-70%iger Konfluenz der Zellen wurde das Medium entfernt und die adhärenen Zellen in den Kammern vorsichtig mit 250 μl frischem, vorgewärmtem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem Endvolumen von 500 μl in Medium mit 4 % PFA für 20 min auf dem Taumler bei

Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde anschließend abgenommen und die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde 200 µl 0,1 % Triton in PBS in die Kammern gegeben und die Zellen für 30-45 min auf dem Taumler inkubiert. Nach Abnahme der 0,1 % Tritonlösung wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindestellen mit 5 % Eselserum in 200 µl PBS für 10 min inkubiert. Danach wurde der primäre, unkonjugierte Antikörper zu den Zellen hinzugegeben (30-60 min Inkubationszeit). Nach zweimaligem Waschen mit 0,01 % Triton in PBS wurde der sekundäre, fluorochromkonjugierte Antikörper hinzugegeben (30-60 min Inkubationszeit). Danach wurden die Zellen in den Kammern zweimal gespült und einmal für 10 min mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des PBS wurden die Kammern mit einem Skalpell von dem Objektträger getrennt. Sobald die Zellen auf dem Objektträger getrocknet waren, wurden 25 µl Eindeckelmedium (ProLong Antifade Gold, Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), welches DAPI, einen kernfärbenden blauen Farbstoff, enthielt, in kleinen Tropfen auf dem Objektträger verteilt und das Präparat für folgende mikroskopische Untersuchungen mit einem Deckglas bedeckt.

Tab. 6 : Für immunhistochemische Färbungen verwendete Antikörper und Seren

Auflistung aller verwendeten Antikörper unterteilt nach CD-Nomenklatur, Spezies, Konzentrationsangabe, Klon und Firma sowie den verwendeten Seren

Primäre Antikörper				
Anti	Spezies	Konzentration	Klon	Firma
CD34	Maus anti Mensch	1:50	581	Exbio
CD44	Maus anti Mensch	1:50	J.173	Exbio
vWF	Maus anti Mensch	1:200	polyklonal	BD
Sekundäre Antikörper				
Sekundäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Firma	
Alexa 488	Ziege anti Maus	1:1000 extra; 1:1500 intra	Invitrogen	
FAB Cy3	Affe anti Maus	1:50 extra; 1:300 intra	Dianova	
Seren				
Seren	Stock	Konzentration	Firma	
Serum aus Maus	50 mg/ml	5-10 %	Dianovo	
Serum aus Kaninchen	60 mg/ml	5-10 %	Dianovo	
Serum aus Affe	60 mg/ml	5-10 %	Dianovo	

2.2.8 Zellkernfärbungen

Durch Kernfarbstoffe sollte eine durchflusszytometrische Separation von ein- und mehrkernigen Zellen, entsprechend dem Prinzip von Zellzyklusanalysen, angestrebt werden.

2.2.8.1 Kernfärbung an fixierten Zellen

Der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Abs_{max} 358 nm/ Em_{max} 461 nm) lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. DAPI bindet ebenfalls an RNA, jedoch fünfmal schwächer als an AT-reiche DNA. Das in dieser Arbeit verwendete DAPI (50 ng/ml) wurde mittels Eindeckelmedium zu dem Zellpräparat hinzugegeben (ProLong Antifade Gold, Invitrogen).

2.2.8.2 Kernfärbung an lebenden Zellen

-Hoechst 33342

Zur Kernfärbung von lebenden Zellen wurde der zellpermeable Farbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) (Abs_{max} 350 nm/ Em_{max} 461 nm) verwendet, welcher an Nukleinsäuren, insbesondere an die AT-reiche doppelsträngige DNA, bindet. Die in dieser Arbeit verwendeten endothelialen Vorläuferzellen wurden mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml Hoechst 33342 im adhärenen Zustand in EGM-2 für drei min bei 37 °C inkubiert. Das restliche ungebundene Hoechst 33342 wurde durch einen Wechsel des Mediums entfernt.

-Vybrant DyeCycle ruby

Die Lebendkernfarbstoffe *Vybrant DyeCycle* (Invitrogen) sind zellpermeabel, DNA-selektiv und nicht fluoreszierend, bis sie an doppelsträngige Nukleinsäuren gebunden haben. Für die Kernfärbung von ECFCs wurde eine 2,5 µM Färbelösung angesetzt sowie eine Zellsuspension von 5×10^5 Zellen pro ml in Medium vorbereitet. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl ($\sim 2,5 \times 10^5$ ECFCs) der vorbereiteten Zellsuspension mit der gewünschten Menge des *Vybrant DyeCycle* inkubiert (37 °C für 15-30 min).

lichtgeschützt) und anschließend direkt durchflusszytometrisch analysiert. Das *Vybrant dye ruby* wird bei einer Wellenlänge von 488 nm als auch bei 633 nm angeregt.

-Syto Blue Fluorescent Nucleid acid stain

Für die Kernfärbung von ECFCs mit dem Lebendkernfarbstoffe *Syto Blue Fluorescent Nucleid acid stain 42/45 (Invitrogen)* wurde eine 1 μ M Färbelösung angesetzt. Die vorbereitete Zellsuspension (1×10^6 Zellen pro ml) wurde mit der Färbelösung bei 37 °C für 15-30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Medium, um das restliche DMSO und die Färbelösung zu entfernen, wurden die gefärbten Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abs_{max} 433 nm/ Em_{max} 460 nm).

2.2.9 Statistische Analysen

Ausgewertete Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz (p) der Differenz zwischen zwei Messungen wurde über den zweiseitigen, gepaarten Students t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant (*) und von $p < 0,005$ als hoch signifikant (**) gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Anzucht von endothelialen koloniebildenden Vorläuferzellen

Gegenstand dieser Arbeit war die Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen, im Wesentlichen von endothelialen koloniebildenden Vorläuferzellen (*endothelial colony forming cells/ECFCs*), welche aus Nabelschnurrestblut herangezogen wurden.

Insgesamt konnten aus 36 von 87 aufgearbeiteten Nabelschnurbluten erfolgreich ECFC-Linien angezogen werden. Hierbei wurden erste Kolonien nach einem Zeitraum von sieben bis vierzehn Tagen detektiert.

Die Anzucht von ECFC-Linien aus aufgearbeitetem Nabelschnurrestblut aus zwei verschiedenen Blutbeuteltypen wurde verglichen. Hierbei wurden zum einen Blutbeutel der Firma Macopharma International GmbH (Langen, Deutschland) und zum anderen der Firma Fresenius Netcare GmbH (Bad Homburg v.d.H., Deutschland) verwendet. Aus den 58 aufgearbeiteten Nabelschnurrestbluten, die in Blutbeutel der Firma Macopharma abgenommen wurden, konnten aus 35 ECFC-Linien angezogen werden (= 60,34 %). Von den 29 aufgearbeiteten Nabelschnurrestbluten aus den Blutbeuteln der Firma Fresenius wurde aus einem Nabelschnurrestblut eine ECFC-Linie erhalten (= 3,33 %). Die Zellen dieser ECFC-Linie differenzierten bereits nach 2 Passagen und konnten für keine Versuche verwendet werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Blutbeutel der Firma Fresenius nicht weiter verwendet.

ECFCs der Passage (p) 1-2 weisen ein dichtes Wachstum auf, in denen die Zellen aneinander liegen, was als „Kopfsteinpflaster-Morphologie“ bezeichnet wird (Hirschi et al., 2008) (Abb. 8-A). Bei ECFC-Kolonien ab p3 wurden zwei morphologisch unterschiedliche ECFC-Typen beobachtet. Der erste Typ erhielt die Kopfsteinpflaster-Morphologie aufrecht, während bei den ECFCs des zweiten Typs zusätzlich die Bildung von ovalen, durch eine äußere Endothelschicht abgegrenzte „Nester“ beobachtet wurde (Abb. 8-B).

Von den 36 angezogenen ECFC-Linien zeigten 28 (= 77,8 %) die Morphologie des ersten Typs, der zweite Typ konnte nur knapp bei jeder 4 Anzucht beobachtet werden. Die

morphologisch unterschiedliche Entwicklung von ECFCs deutete auf ein heterogenes Zellgemisch innerhalb der ECFC-Kolonie hin.

Als weitere endotheliale Zellquelle wurden humane umbilikale Venenendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*/HUVECs) verwendet. Hierfür wurden insgesamt 10 Nabelschnüre innerhalb von 24 h nach Entbindung aufgearbeitet. HUVECs wuchsen wie ECFCs ebenfalls in einer „Kopfsteinpflaster-Morphologie“ (Abb. 8-C), weisen ein starkes proliferatives Potential sowie eine morphologisch unterschiedliche Entwicklung auf, die auf ein heterogenes Zellgemisch innerhalb der HUVEC-Kolonie hindeutet (Ingram et al., 2005).

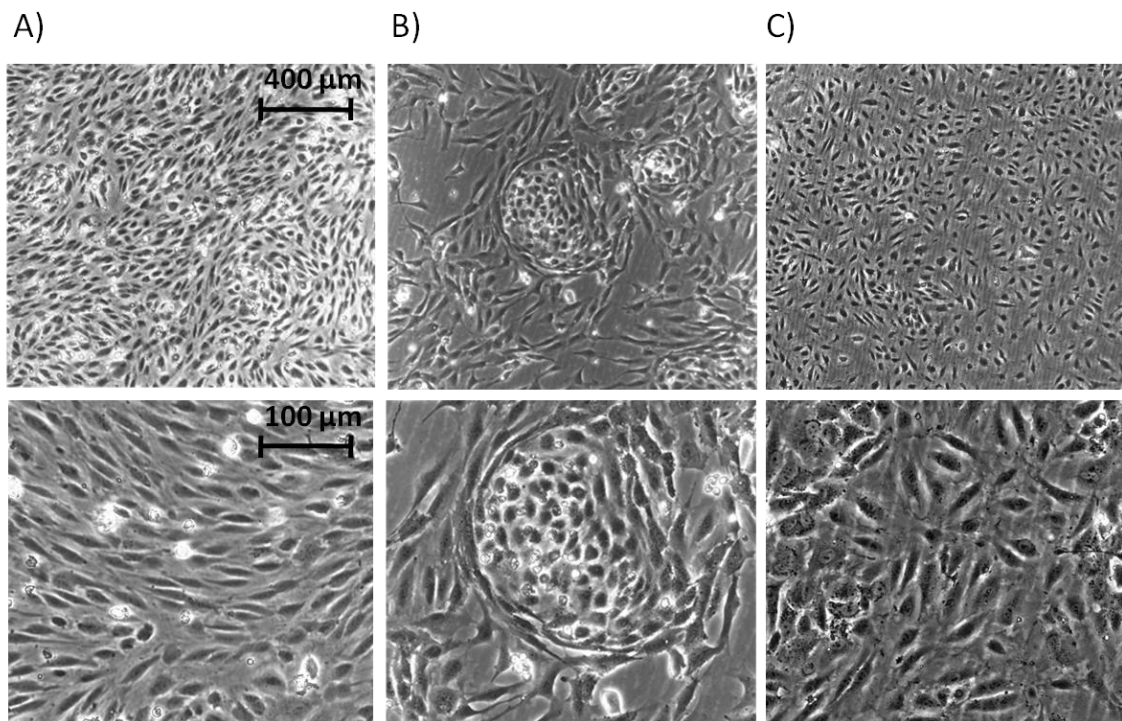


Abb. 8 : Morphologie von ECFCs und HUVECs in vitro.

ECFCs bilden phänotypisch unterscheidbare Morphologien aus (A-B). Ein dichtes Wachstum der Zellen, in denen diese aneinander liegen, wird als „Kopfsteinpflaster-Morphologie“ bezeichnet (A). Ein anderer Typ der Morphologie stellt die Bildung von ovalen „Nestern“ dar, in denen die innenliegenden Zellen von einer äußeren Schicht aus ECFCs von den umliegenden Zellen abgegrenzt werden (B). HUVECs wachsen wie auch ECFCs in einer „Kopfsteinpflaster-Morphologie“ (C).

3.2 Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen

Da ECFCs aus Nabelschnurblut herangezogen und HUVECs aus der Nabelschnurvene gewonnen werden, und diese Quellen unter anderem noch mesenchymale und hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen enthalten können, musste zunächst eindeutig die endotheliale Natur der putativen ECFCs bzw. HUVECs ermittelt werden.

Die Expression von beschriebenen Oberflächenantigenen wurde vergleichend auf ECFCs und HUVECs analysiert. Hierbei gilt die Präsenz von CD31 (PECAM), CD105 (Endoglin), CD144 (VE-Cadherin) und VEGF-R2 (KDR) auf der Zelloberfläche als endotheltypisch (Case et al., 2007; Critser and Yoder, 2010; Steurer et al., 2008). Monozyten bzw. Makrophagen exprimieren neben den genannten Endothel-typischen Oberflächenantigenen auch die Oberflächenproteine CD14, CD15, CD45 und CD133 (Case et al., 2007; Critser and Yoder, 2010; Steurer et al., 2008), wodurch sie von ECFCs und HUVECs unterschieden werden können. Zur Unterscheidung zwischen endothelialen- und mesenchymalen Vorläuferzellen wurde das Oberflächenprotein CD90 verwendet, welches auf mesenchymalen und Fibroblasten-ähnlichen Zellen, jedoch nicht auf Endothelzellen, exprimiert wird (Caplan, 1991; Mafi et al., 2011). Zur Diskriminierung von endothelialen Vorläuferzellen und Endothel-ähnlichen Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen des Zelloberflächenprofils durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten endothelialen Vorläuferzellen exprimierten die Oberflächenantigene CD31, CD105, CD144, CD146 und VEGF-R2 (Abb. 9-A) und nicht die hämatopoetischen Oberflächenproteine CD14, CD15, CD45 und CD133 (Abb. 9-B). Ebenso exprimierten diese Zellen kein CD90 auf der Zelloberfläche (Abb. 9-B).

Als weitere endothelspezifische Charakteristika wurde die Bindung von *Ulex europaeus* I (UEA-I), eine intrazelluläre Ansammlung des von-Willebrand-Faktors (vWF) und die Aufnahme von acetyliertem Lipoprotein niederer Dichte (*Acetylated Low Density Lipoprotein*/AcLDL) sowie die Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel untersucht. Die spezifische Bindung des Lektins UEA-I, das an Rückstände der L-Fucose auf Endothelzellen bindet (Holthofer et al., 1982; Hormia et al., 1983), wurde bei allen verwendeten ECFCs und HUVECs nachgewiesen (Abb. 9-A). Eine intrazelluläre Ansammlung des vWF (Abb. 9-C) (Hannah et al., 2002; Michaux and Cutler, 2004; van

Mourik et al., 2002) und die Aufnahme von AcLDL (Abb. 9-D) (Voyta et al., 1984) wurde ebenfalls bei diesen Zellen nachgewiesen. Alle in dieser Arbeit verwendeten ECFC- und HUVEC-Linien bildeten tubulärartige Strukturen im Matrigel aus, einem *in vitro*-Nachweis der angiogenen Aktivität von Endothelzellen (Abb. 9-E). Zusammengefasst weisen alle Ergebnisse darauf hin, dass in dieser Arbeit endotheliale Vorläuferzellen und keine Endothel-ähnlichen Zellen verwendet wurden.

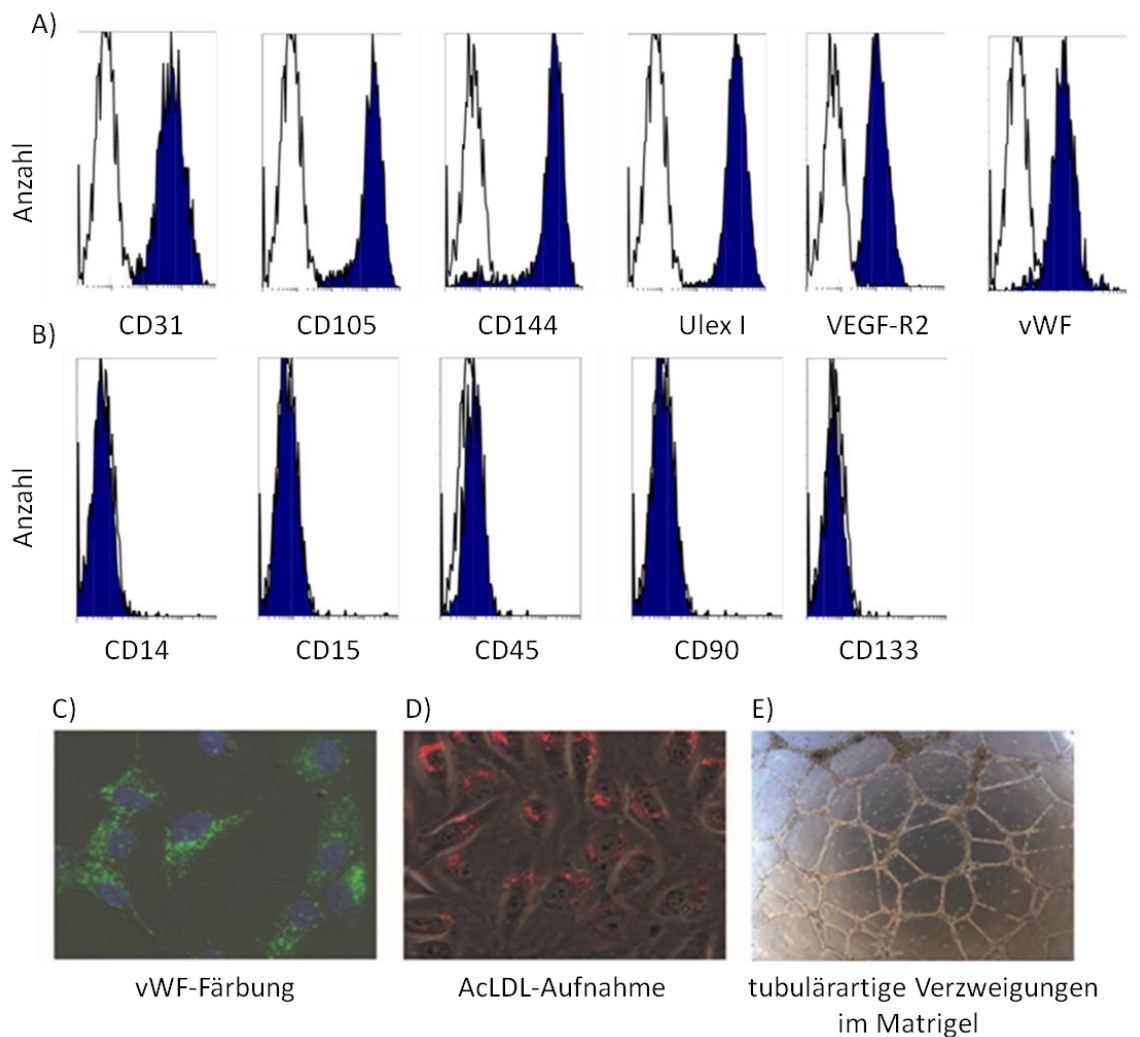


Abb. 9 : Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen.

Durchflusszytometrischer Nachweis endotheltypischer (A) und nicht typischer (B) Oberflächenantigene auf der Zelloberfläche endothelialer Vorläuferzellen; Im Histogramm dargestellt ist in weiß die Isotypkontrolle und in blau die Expressionsstärke des jeweiligen Oberflächenantigens; Mikroskopische Aufnahmen: (C) vWF-Färbung (grün: vWF, blau: Zellkerne; (D) ECFCs nach Aufnahme von AcLDL (rot); (E) Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel; (C-D): 200-fache Vergrößerung, Phasenkontrast; (E) 50-fache Vergrößerung, Phasenkontrast

3.2.1 Proliferationsverlauf von endothelialen Vorläuferzellen *in vitro*

In Kultur kann das proliferative Verhalten von ECFCs in 3 Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase beschreibt den Zeitraum (1 bis 2 Wochen) in dem es zum Auswachsen der ECFCs aus dem Nabelschnurblut kommt. Das Ende dieser Phase ist bestimmt durch das Erreichen einer 80 % Besiedlung des Kulturgefäßes (Konfluenz) und der darauf folgenden Subkultivierung. Die zweite Phase (2-6 Wochen) ist gekennzeichnet von sich schnell teilenden Zellen, die einen einschichtigen Zellrasen ausbilden. Das Ende von Phase zwei ist mit dem Einsetzen der Differenzierung erreicht. In der dritten Phase sinkt die mitotische Aktivität der kultivierten Zellen. *In vitro* kultivierte ECFCs wiesen in Phase 2 (p1-4) ein relativ hohes Proliferationspotential auf (mittlere Zellverdopplungszeit $27,4 \text{ h} \pm 2,5 \text{ h}$, $n=6$), welches mit zunehmender Passage (p5-12) abnahm (mittlere Zellverdopplungszeit $79,5 \text{ h} \pm 42,41 \text{ h}$, $n=6$) und schließlich zum Erliegen kam. Der beobachtete Rückgang der mittleren Zellverdopplungszeit zeigt, dass bei einem zunehmenden Teil der ECFCs die Teilungsfähigkeit entweder abnahm oder ganz verloren ging. Deshalb endete das Wachstum der Population nicht innerhalb eines kurzen Zeitraums, sondern verringerte sich kontinuierlich innerhalb von Wochen. Einhergehend mit der einsetzenden Differenzierung wurde eine Vergrößerung der Zellmorphologie sowie ein erhöhter Anteil von Zellen mit mehreren Kernen beobachtet, weshalb Mehrkernigkeit ein mögliches Kriterium für Reifung darstellt.

Ein Vergleich sieben unabhängiger ECFC-Linien zeigte, dass die angezogenen ECFCs starke individuelle Schwankungen bezüglich ihres proliferativen Potentials besaßen. So wurden ECFC-Linien angezogen, deren Zellen sich über 30mal teilten jedoch auch ECFC-Linien angezogen, die sich 5mal teilen konnten (Abb. 10). Diese Beobachtung ließ annehmen, dass ECFC-Linien mit einer hohen Zellverdoppelung eine primitive Subpopulation enthielten, die ein hohes proliferatives Potential besaß. Dementsprechend bestände jede ECFC-Linien aus einem heterogenen Zellgemisch primitiverer (stark proliferierenden) und reiferer (weniger stark proliferierenden) Zellen.

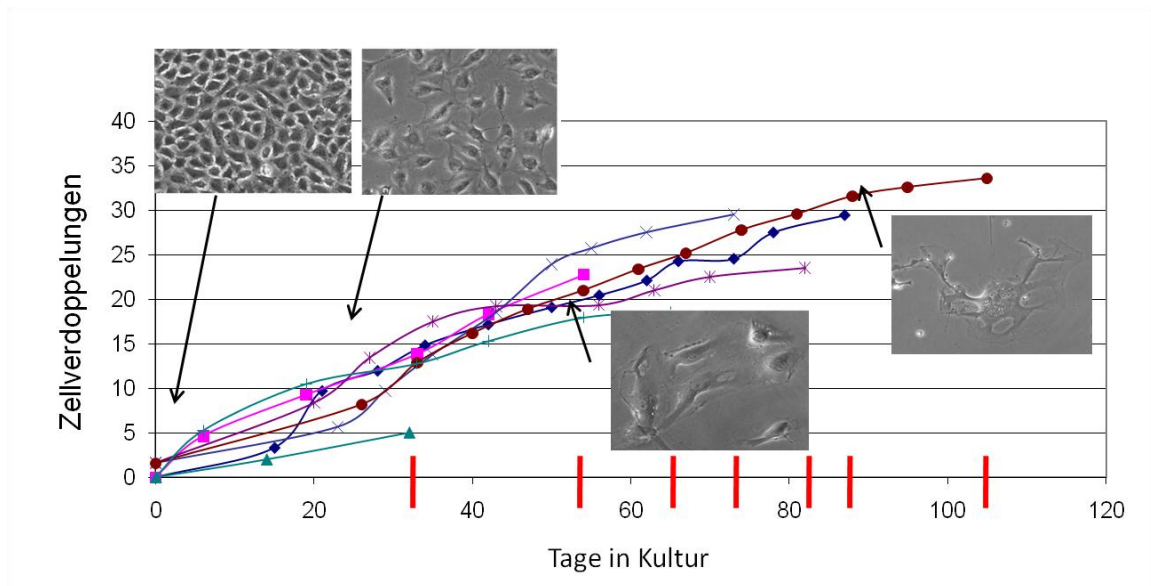


Abb. 10 : Zellverdoppelungen unterschiedlicher ECFC-Linien in vitro.

Aus verschiedenen Nabelschnurbluten ausgewachsene ECFC-Linien wiesen eine unterschiedliche Kapazität an Zellteilungen auf, die sich durch einen postmitotischen Arrest an unterschiedlichen Zeitpunkten auszeichneten (rote Balken). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen geben die morphologische Entwicklung der Zellen während der Zeit wieder.

3.3 Endotheliale Vorläuferzellen weisen eine Hierarchie unterschiedlicher Progenitorzellen auf

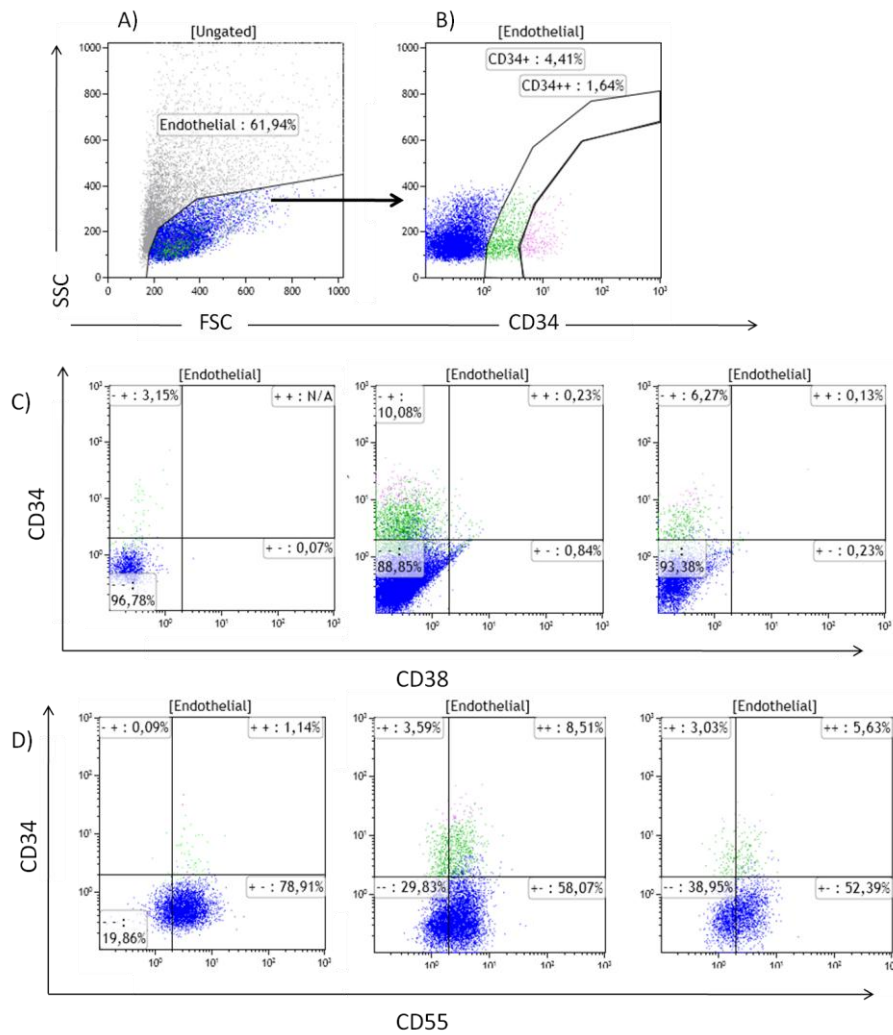
Die in 3.2 beschriebene Heterogenität weist darauf hin, dass endotheliale Vorläuferzellen eine Hierarchie unterschiedlicher Progenitorzellen ausbilden, für deren Diskriminierung bisher noch keine Oberflächenmarker identifiziert worden sind. Endotheliale Vorläuferzellen können morphologisch und durchflusszytometrisch als heterogene Zellpopulation dargestellt werden. Dies ermöglichte es einzelne Teilpopulationen voneinander zu trennen und sowohl funktionell als auch deskriptiv zu analysieren.

Der Arbeitshypothese zur Folge, kommen unterschiedliche Subpopulationen verschiedener hierarchischer Entwicklungsstufen in einer ECFC-Linie vor. Jedes der in der ECFC-Linie heterogen exprimierten Oberflächenproteine könnte einen Kandidaten zur Beschreibung dieser Hierarchie darstellen. Deshalb wurde nach Oberflächenproteinen gesucht, die heterogen innerhalb der ECFC-Linie exprimiert wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurde das Oberflächenprotein CD34 als heterogen exprimierter Oberflächenmarker innerhalb bestehender ECFC-Linien identifiziert und

deshalb als erster fester Marker in einem erweiterten antikörperbasierendem Analyseverfahren verwendet (Abb. 11-B). In drei unabhängigen Versuchen wurden endotheliale Vorläuferzellen in frühen Passagen (p3-4) gegen CD34-ECD (*Energy coupled dye*) und 106 weitere FITC- (Fluorescein Isothiocyanate) und PE- (Phycoerythrin) konjugierte Antikörper, gerichtet gegen unterschiedliche Oberflächenantigene, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Von den 106 gemessenen Oberflächenantigenen waren 77 nicht auf endothelialen Vorläuferzellen exprimiert (Abb. 11-C zeigt ein exemplarisches Beispiel) (Tab. 7). Zur Unterteilung verschiedener Zellpopulationen wurden die restlichen 29 detektierten Oberflächenantigene aufgrund ihres Expressionsmusters in Bezug auf die Expression von CD34 analysiert. Bei 16 der 29 Oberflächenantigene war die Expressionsstärke auf den CD34 positiven und negativen Zellen vergleichbar (Abb. 11-D).

Die restlichen 13 Oberflächenantigene (CD13, CD31, CD40, CD44, CD54, CD63, CD102, CD123, CD146, CD151, CD166, CD252 und VEGF-R2) wiesen gegen CD34 eine heterogene Verteilung auf. Die Oberflächenantigene CD13, CD31, CD40, CD54, CD63, CD102, CD123 und der VEGF-R2 waren auf den CD34 positiven Zellen stärker exprimiert, als auf den CD34 negativen/schwach positiven Zellen. Entsprechend wurden sie in eine Gruppe (Gruppe 1) zusammengefasst (Abb. 12). Die höchste Expression der Oberflächenantigene CD44, CD146, CD151, CD166 und CD252 wurde auf den CD34 negativen Zellen nachgewiesen. Dementsprechend wurden sie in eine weitere Gruppe (Gruppe 2) zusammengefasst (Abb. 13).

**Abb. 11 : Expressionsmuster.**

(A) Darstellung der ECFCs im FSC/SSC sowie Festlegung des Endothelgates; **(B)** Darstellung der Farbgebung für CD34^{neg} und CD34^{pos} ECFCs innerhalb des Endothelgates: in blau CD34^{neg}, in grün CD34⁺, in rot CD34⁺⁺; **(C)** Repräsentative Darstellung eines auf der Zelloberfläche nicht exprimierten Oberflächenantigens am Beispiel von CD38 (an 3 unabhängigen ECFC-Kolonien); **(D)** Darstellung eines als homogen bezeichneten Expressionsmusters am Beispiel von CD55 (an 3 unabhängigen ECFC-Kolonien).

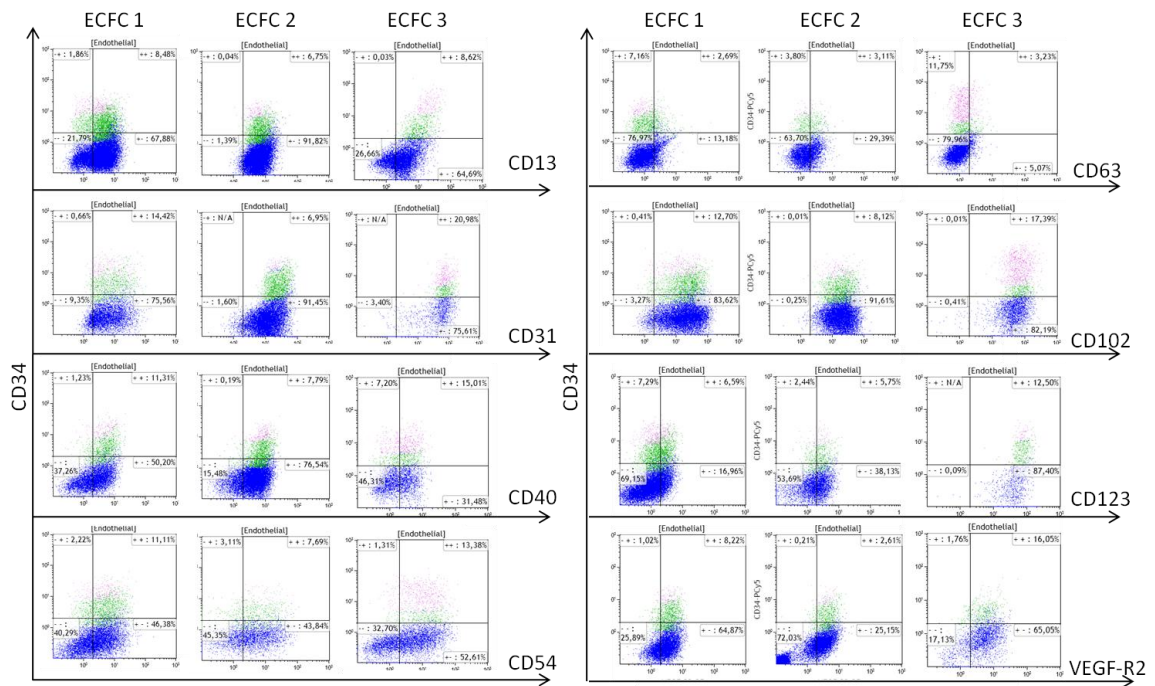


Abb. 12 : Expressionsmuster der Oberflächenantigene aus Gruppe 1 dargestellt an drei unabhängigen ECFC-Populationen.

Eine stärkere Expression der Oberflächenantigene CD13, CD31, CD40, CD54, CD63, CD102, CD123 und VEGF-R2 wurde auf den CD34^{pos} Zellen im Vergleich zu den CD34^{neg} Zellen detektiert.

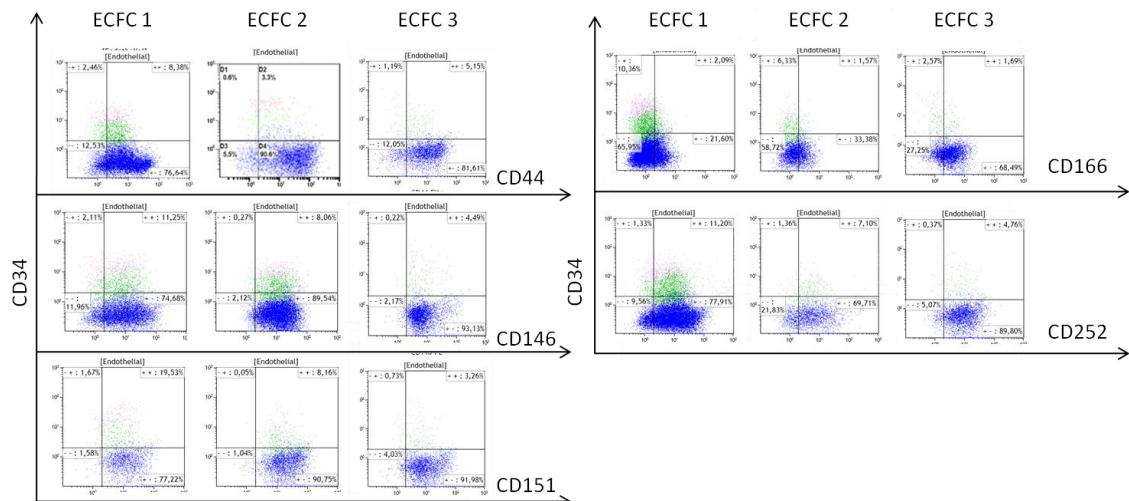


Abb. 13 : Expressionsmuster der Oberflächenantigene aus Gruppe 2.

Die höchste Expression der Oberflächenantigene CD44, CD146, CD151, CD166 und CD252 befindet sich auf den CD34 negativen Zellen.

Tab. 7 : Übersicht der Expressionsstärke der 107 getesteten Oberflächenantigene auf ECFCs.

grau: nicht exprimierte Oberflächenantigene; grün Oberflächenantigene, die sowohl auf den CD34⁺ als auch CD34⁻ Zellen gleich stark exprimiert wurden; blau: Oberflächenantigene, die auf CD34 positiven Zellen stärker exprimiert waren als auf den CD34 negativen Zellen; pink: Oberflächenantigene, die auf den CD34 negativen Zellen stärker exprimiert waren als auf den CD34 positiven Zellen (n=3).

CD2		CD29	grün	CD49b	grün	CD74		CD119		CD184	
CD4		CD30		CD49d		CD79b		CD122		CD200	
CD7		CD31	blau	CD49e	grün	CD81	grün	CD123	blau	CD252	pink
CD8		CD33		CD49f	grün	CD82	grün	CD126		CD253	
CD9		CD34	blau	CD50		CD83		CD127		CD312	
CD10		CD36		CD52		CD87		CD131		CD324	
CD11a		CD37		CD53		CD90		CD133		CD333	
CD11b		CD38		CD54	blau	CD95		CD135		BCRP1	
CD11c		CD40	blau	CD55	grün	CD97		CD135R		EPCAM	
CD13	blau	CD41		CD56		CD99		CD138		EphB2	grün
CD14		CD41a		CD58	grün	CD102	blau	CD144	grün	HLA-ABC	grün
CD15		CD43		CD59		CD103		CD146	pink	HLA-DR	
CD18		CD44	pink	CD62L		CD105	grün	CD150		MDR1	
CD24		CD45		CD62P		CD106		CD151	pink	VEGF-R1	
CD25		CD45RA		CD63	blau	CD109		CD152		VEGF-R2	blau
CD26		CD46	grün	CD69		CD110		CD156b		VEGF-R3	
CD27		CD47	grün	CD71		CD116		CD164		vWF	grün
CD28		CD48		CD73	grün	CD117		CD166	pink		

Die stärkste Auftrennung verschiedener ECFC-Linien gelang mit den Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD34 aus der Gruppe 1 und gegen das Oberflächenantigen CD44 aus der Gruppe 2. Die Expressionsstärke von CD44 ließ sich in eine positive (CD44⁺) und eine stark positive (CD44⁺⁺) unterteilen. Die Zellen mit der stärksten Oberflächenexpression von CD44 (CD44⁺⁺) exprimierten kein CD34 auf der Zelloberfläche und werden im weiteren Verlauf als CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion bezeichnet. Die Zellen, die eine schwächere Oberflächenexpression von CD44 aufwiesen, konnten in eine CD34⁺ und eine CD34⁻ Zellfraktion unterteilt werden und werden dementsprechend im weiteren Verlauf als CD44⁺CD34⁻ und CD44⁺CD34⁺ Zellfraktion bezeichnet.

Ein Vergleich von unabhängig angezogenen ECFC-Linien in Passage 4 zeigte, dass der Anteil an CD34⁺ Zellen je nach Kolonie zwischen 0,3 % bis > 30 % lag (Abb. 14-A). Ebenfalls wurden CD34⁻ ECFC-Linien detektiert, welche anfangs eine relativ homogene

Expression von $CD44^{++}$ aufwiesen (Abb. 14-B) und erst im weiteren Verlauf der Kultivierung eine Unterteilung in die Zellfraktionen $CD44^{+}$ und $CD44^{++}$ zeigte (Abb. 15). Aus den $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen konnte sowohl die Subpopulation $CD44^{+}CD34^{-}$ als auch $CD44^{+}CD34^{+}$ hervorgehen. Im Laufe der Kultivierung reduzierte sich sukzessive der Anteil an $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen und der Anteil an $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen nahm zu. Auch wurden in Passage 4 ECFC-Linien detektiert, die eine sehr kleine Menge an $CD44^{++}$ Zellen und eine relativ hohe Anzahl an $CD34^{+}$ Zellen beinhalten (Abb. 14-C).

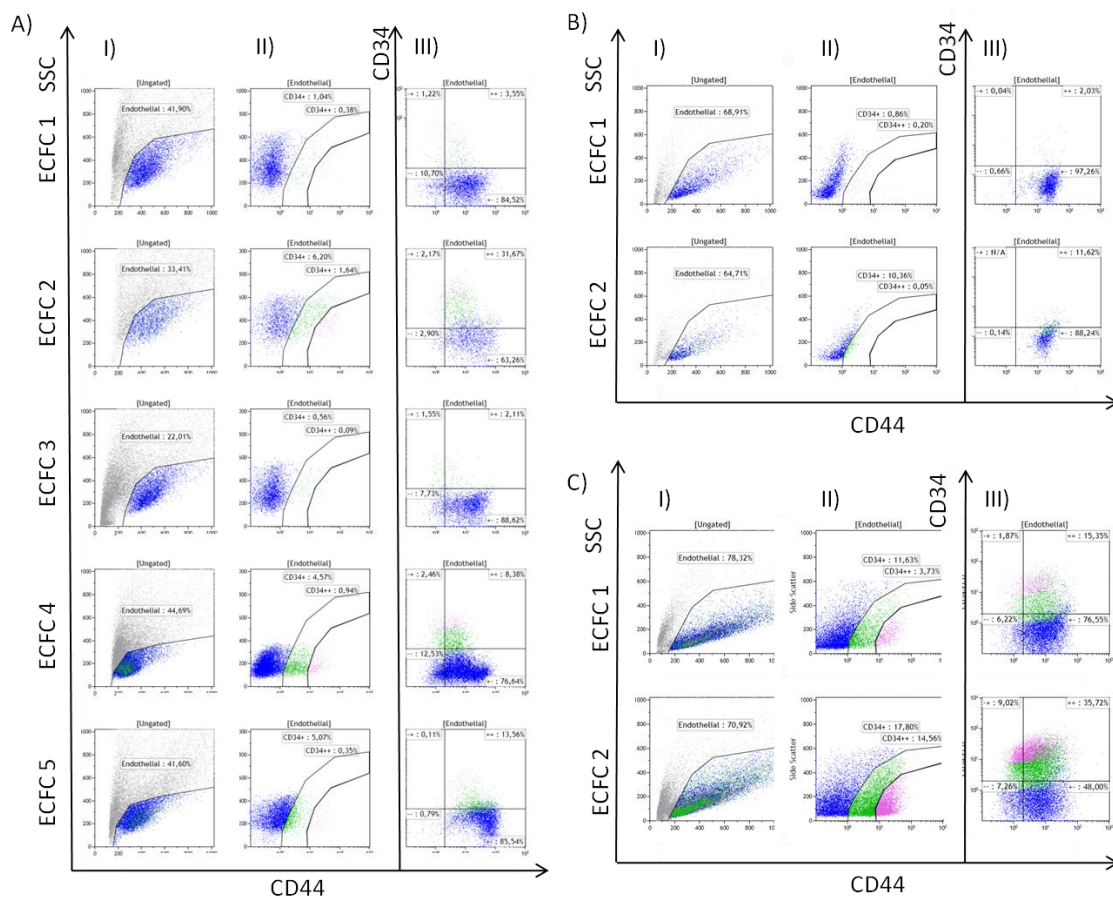


Abb. 14 : Vergleich der CD34 und CD44 Oberflächenexpression von unabhängig angezogenen ECFC-Linien.

Vergleich der Oberflächenexpression von CD34 und CD44 auf unabhängig angezogenen ECFC-Linien in Passage 4. I) Darstellung der ECFCs im FSC/SSC, Gatingstrategie der lebenden Zellen (Endothelial); II) CD34/SSC Darstellung sowie Farbeinteilung der CD34 negativen (blau), CD34 schwach positiven (grün) und CD34 stark positiven (rosa) ECFCs; III) CD44/CD34 Darstellung. **(A)** Expressionsmuster von CD34 und CD44 erlaubt eine Unterteilung der ECFC-Linie in die drei Subfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$. Der Anteil $CD34^{+}$ Zellen in den jeweiligen Populationen variiert von 0,3 % bis >30 %. **(B)** $CD34^{-}$ ECFC-Linien mit einer relativ homogenen Expression von $CD44^{++}$. **(C)** ECFC-Linien mit einem geringen Anteil an $CD44^{++}$ Zellen und einem relativ hohen Anteil an $CD34^{+}$ Zellen.

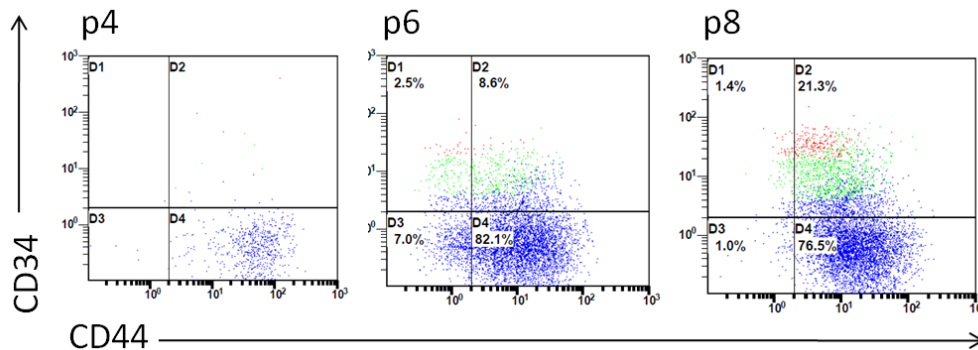


Abb. 15 : Entwicklung der drei Subpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ in vitro. Oberflächenexpressionsveränderung von CD34 und CD44 in Passage 6 und 8, ausgehend von einer relativ homogen exprimierenden $CD44^{++}$ ECFC-Linie in Passage 4.

Aus einer ursprünglichen $CD44^{++}CD34^{-}$ ECFC-Linie bildeten sich im Verlauf der Kultur kontinuierlich $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen. Einhergehend nahm der Anteil an $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen ab. Dies deutete darauf hin, dass die Fraktion der $CD44^{++}CD34^{-}$ ECFCs die primitivsten ECFCs darstellten und mit der Differenzierung der Zelle die Expression von extrazellulärem CD44 herunterreguliert, wohingegen die Expression von extrazellulärem CD34 hochreguliert wird. Somit würden die $CD44^{+}CD34^{+}$ ECFCs reifere endotheliale Vorläuferzellen darstellen.

3.3.1 Aktivierung endothelialer Vorläuferzellen als möglicher Grund für eine heterogene Expression von Oberflächenproteinen

Mit dem Modell der hierarchischen Entwicklung können die Ergebnisse der heterogenen Verteilung verschiedener Oberflächenantigene innerhalb der ECFC-Linien erklärt werden, jedoch gibt es auch andere mögliche Ursachen, die zur Erklärung unserer Beobachtungen herangezogen werden können. Aktivierte Zellen innerhalb der ECFC-Linie könnten aufgrund ihres Aktivierungsstatus ein anderes Expressionsprofil von Oberflächenantigenen aufweisen. Aktivierte Endothelzellen fungieren proinflammatorisch, indem sie beispielsweise die in den Weibel Palade-bodies (WPB) angesammelten Proteine vWF und CD62E (E-Selektin) exozytieren (Hannah et al., 2002; van Mourik et al., 2002), wobei durch die Ausschüttung des vWF blutungsstillende Mechanismen induziert werden (Sadler, 1998). Durch proinflammatorische Zytokine wird die Expression des Proteins CD62E auf der

Zelloberfläche von Endothelzellen induziert und vermittelt die Adhäsion von Leukozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) an das Endothel sowie die Transmigration der Leukozyten durch den Endothelmonolayer in das inflammatorische Gewebe (Ruiz-Torres et al., 2006). Ebenfalls ist für Endothelzellen bekannt, dass diese durch die Stimulation des inflammatorischen Zytokins TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) die Oberflächenantigene CD54, CD62E und CD106 erhöht exprimieren, sowie bedingt durch Dissoziation des Oberflächenproteins CD102, eine verringerte Expression dieses aufweisen (Almenar-Queralt et al., 1995; Carlos et al., 1990; Chiu et al., 2004; Henninger et al., 1997; Horgan et al., 1991; Kameda et al., 1997; Muro and Muzykantov, 2005; Remy et al., 1999; Sadeghi et al., 2004).

Somit spielen Endothelzellen eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen, weshalb neben der Aktivierung durch TNF- α auch weitere inflammatorische Stimulantien zu einer Aktivierung und somit zu einer veränderten Oberflächenexpression von Endothelzellen führen könnte. Deshalb wurden die inflammatorischen Stimulantien Histamin, Hitzeschock, IFN, LPS und VEGF zur Aktivierung von ECFCs getestet und werden deshalb im Folgenden kurz beschrieben:

Histamin: Das Hormon Histamin ist an der Abwehr körperfremder Stoffe beteiligt sowie es als Mediators substanz bei Entzündungen und Verbrennungen fungiert (Marshall, 1984; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2006; Zhao et al., 2006).

Hitzeschock: Eine Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 40 °C simuliert den Endothelzellen eine Reaktion des Körpers auf eine Infektion mit Viren oder Bakterien (Fieber). Durch den Anstieg der Temperatur werden Stoffwechselvorgänge beschleunigt, welche die Abwehrreaktion des Körpers unterstützen, da vor allem die Aktivität vieler Immunzellen in einem Temperaturbereich von 38 °C - 41 °C gesteigert ist (Barone, 2009; Schaffner, 2006).

IFN- α/γ : Interferone (IFN) sind Zytokine, welche insbesondere durch viral befallene Zellen gebildet werden und eine Abwehrreaktion des Immunsystems auslösen (Farrar and Schreiber, 1993; Schreiber and Farrar, 1993).

LPS: Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Durch eine Infektion dieser Bakterien gelangt das LPS in den Blutkreislauf, wo es als Antigen von Immunzellen, wie Monozyten, erkannt und gebunden wird und über Nf- κ B die Freisetzung von TNF- α induziert (Rivest et al., 2000).

TNF- α : Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Zytokin, welches von Makrophagen hauptsächlich bei lokalen und systemischen Entzündungen ausgeschüttet wird. TNF- α aktiviert verschiedene Immunzellen und induziert Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Hardy et al.; Harris and Keane; Rahman and McFadden, 2006).

VEGF: Durch die Ausschüttung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), werden Endothelzellen zur Proliferation und zur Angiogenese angeregt, ebenfalls wird die Migration von Monozyten und Makrophagen stimuliert (Dowlati; Flamme et al., 1995; Grunewald et al., 2006; Holash et al., 2002; Shweiki et al., 1992).

Im ersten Schritt wurde die Oberflächenexpression der zuvor beschriebenen TNF- α sensitiven Oberflächenantigene CD54, CD62E, CD102 und CD106 auf ECFCs nach Stimulation mit Histamin, Hitzeschock, IFN, LPS, TNF- α und VEGF untersucht (*Tab. 8*). Hierbei wurde erwartet, dass durch die Behandlung mit TNF- α im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die Oberflächenantigene CD54, CD62E, CD106 stärker exprimiert sind und CD102 auf der Zelloberfläche schwächer exprimiert ist.

Die Behandlung von ECFCs mit Histamin und VEGF bewirkte keine erkennbaren Unterschiede der Oberflächenexpression der Oberflächenmoleküle CD54, CD62E, CD102 und CD106 (*Abb. 16*). Die Hitzeschockbehandlung verursachte keine Expressionsveränderung der Oberflächenproteine CD54, CD62E und CD106 (*Abb. 16*). Die Hitzeschockbehandlung rief eine Erniedrigung der Expression des Oberflächenantigens CD102 hervor. IFN- α erhöhte geringfügig die Oberflächenexpression von CD54 auf Zellen, die bereits CD54 exprimieren und induzierte die Oberflächenexpression von CD54 auf der CD54⁺ Subpopulation. Die Stimulation der ECFC-Linien durch IFN- α bewirkte auf einigen Zellen eine Reduktion der Expression von CD102. Eine ähnliche Auswirkung auf die Oberflächenexpression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 induzierte die Stimulation

der Zellen durch LPS und TNF- α (Abb. 16). Die Stimulation durch LPS bewirkte eine Erhöhung der CD54 Oberflächenexpression auf einigen Zellen der ECFC-Linien (Abb. 16), wohingegen die Aktivierung durch TNF- α eine Erhöhung der Oberflächenexpression von CD54 der gesamten Population bewirkte (Abb. 16). Durch die Behandlung mit LPS wurde bei einer Subfraktion der ECFC-Linien (Abb. 16) und durch die Stimulation mit TNF- α die gesamte Population induziert (Abb. 16), CD62E zu exprimieren. In den mit LPS behandelten ECFC-Linien wies ein Teil der Zellen eine reduzierte Expression des Oberflächenproteins CD102 auf (Abb. 16). Nach Aktivierung mit TNF- α war auf der gesamten Zellpopulation die Oberflächenexpression von CD102 erniedrigt (Abb. 16). Durch die Stimulation mit LPS und TNF- α wurde die Expression des Oberflächenproteins CD106 induziert (Abb. 16). Nach Stimulation mit LPS exprimierte eine Subfraktion der ECFC-Linien das Oberflächenantigen CD106 (Abb. 16). Der Hauptanteil der ECFC-Linien exprimierte nach einer Behandlung mit TNF- α das Oberflächenprotein CD106 (Abb. 16). Die Ergebnisse der Aktivierung wurden in Tab. 8 zusammengefasst.

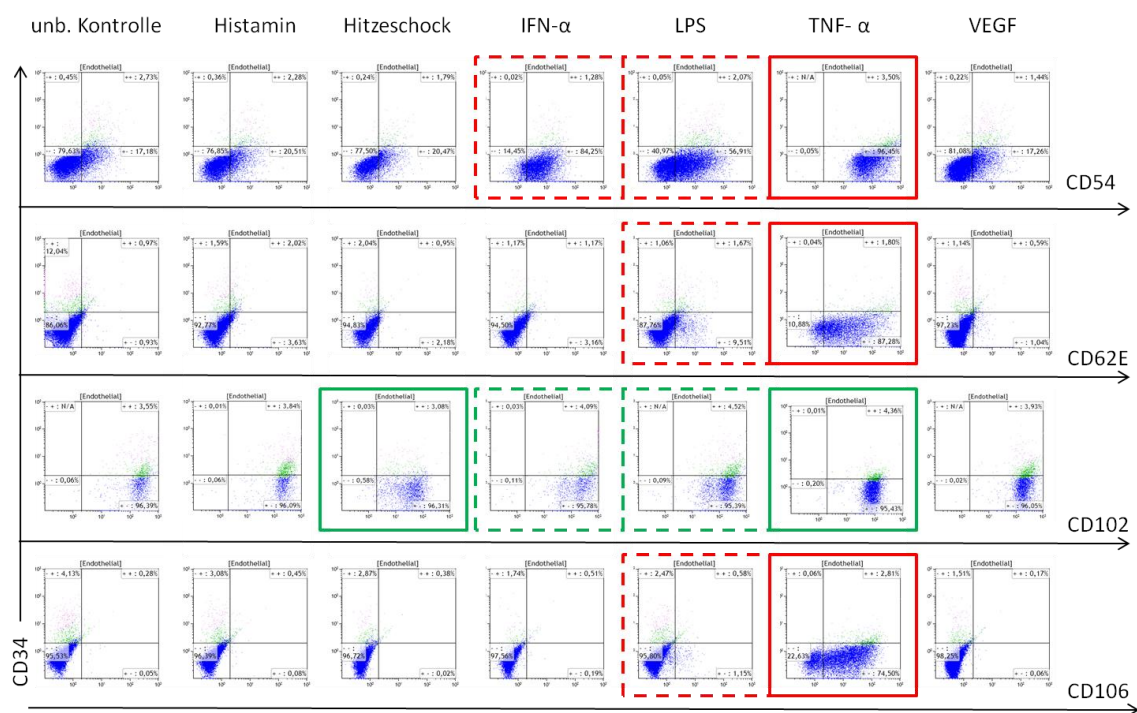


Abb. 16 : Vergleich der Oberflächenexpression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 unbehandelter und stimulierter ECFCs.

Die Behandlung von ECFCs durch Histamin und VEGF hatte keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD54, CD62E, CD102 und CD106. Eine Reduktion des extrazellulären Oberflächenantigens CD102 auf ECFCs wurde durch die Behandlung mit IFN- α , LPS, TNF- α und durch Hitzeschock induziert. Eine erhöhte Oberflächenexpression von CD54 wurde nach Stimulation mit IFN- α , LPS und TNF- α beobachtet, LPS und TNF- α stimulierten die Oberflächenexpression von CD62E und CD106. Repräsentative Darstellung von einer aus drei unabhängigen Versuchen. Grüne Umrandungen heben eine erniedrigte Expression, rote Umrandungen eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers hervor.

Tab. 8 : Übersicht der Expression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 auf ECFCs nach Aktivierung.

Überblick der Expression der stimulationssensitiven Oberflächenproteine CD54, CD62E, CD102 und CD106 nach Behandlung mit verschiedenen inflammatorischen Stimulantien (Histamin, Hitzeschock, IFN- α , LPS, TNF- α und VEGF). Eine minimale Erhöhung wurde durch ein + sowie eine minimale Reduktion der Expression nach Behandlung mit einem – gekennzeichnet. Eine deutlichere Erhöhung/Reduktion wurde demnach mit einem ++/-- gekennzeichnet. Eine starke Expressionserhöhung wie sie bei CD54 nach einer TNF- α Stimulation gemessen wurde, wurde mit +++ markiert. Eine nicht erkennbare Veränderung der Expression wurde durch ein graues Kästchen dargestellt. IFN: Interferon; LPS: Lipopolysaccharid, TNF- α : Tumor Nekrose Faktor- α ; VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

	Histamin	Hitzeschock	IFN- α	LPS	TNF- α	VEGF
CD54			++	+	+++	
CD62E				+	+++	
CD102		-	-	-	--	
CD106				+	+++	

Im Folgenden wurde die Oberflächenexpression der Hierarchie-Kandidaten CD34 und CD44 von unbehandelten ECFCs mit Histamin, Hitzeschock, IFN- α , LPS, TNF- α und VEGF stimulierten ECFCs durchflusszytometrisch quantifiziert und verglichen (n=3) (Abb. 17). Anhand der erzielten Ergebnisse wiesen die unbehandelten und durch Histamin, Hitzeschock, IFN- α , LPS, TNF- α und VEGF stimulierten ECFC-Linien keine konsistenten Unterschiede hinsichtlich der Expression von CD34 und CD44 auf.

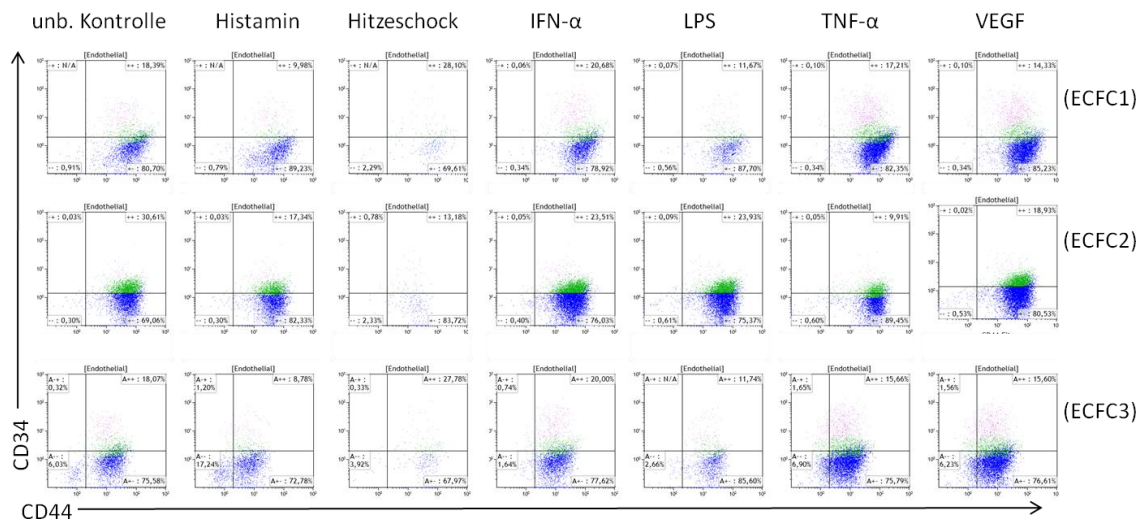


Abb. 17 : Expression von CD34 und CD44 auf unbehandelten und inflammatorisch stimulierten ECFCs.
 In drei unabhängigen ECFC-Linien konnte nach Behandlung mit Histamin, Hitzeschock, IFN-α, LPS, TNF-α und VEGF kein erkennbarer Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD34 und CD44 nachgewiesen werden. In den drei Subfraktionen CD44⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁺ und CD44⁻CD34⁺ waren keine konsistenten Unterschiede nach Stimulation durch Histamin, Hitzeschock, IFN-α, LPS, TNF-α und VEGF erkennbar.

Da nach Aktivierung der ECFCs die Subpopulationen CD44⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁺ und CD44⁻CD34⁺ unverändert blieben, konnte eine Aktivierung als Grund für diese Heterogenität ausgeschlossen werden.

3.3.1.1 Vergleich der Expression der übrigen Kandidaten nach Aktivierung

Es wurde untersucht, ob die Oberflächenexpression der übrigen Kandidaten aus Gruppe 1 (CD13, CD31, CD40, CD63, CD123 und VEGF-R2) und Gruppe 2 (CD146, CD151, CD166, CD252) auch (wie CD34 und CD44) aktivierungsunabhängig exprimiert werden. Der stärkste Effekt auf die Oberflächenexpression von CD54, CD62E, CD102 und CD106 wurde durch die Stimulation der Zellen durch TNF-α induziert, weshalb auch die Oberflächenexpression der anderen Kandidaten nach TNF-α Stimulation analysiert wurde.

Zwischen den nicht aktivierten und den durch TNF-α aktivierten Zellen zeigte sich kein erkennbarer Unterschied in Bezug auf deren Expressionsstärke der Oberflächenproteine CD13, CD31, CD40, CD63, CD123 und VEGF-R2 aus Gruppe 1

(Abb. 18). Die Expression der sich in Gruppe 1 befindenden Kandidaten CD54 und CD102 wurde bereits als TNF- α sensitiv beschrieben (siehe 3.3.1), jedoch blieb die heterogene Verteilung innerhalb der Zellen erhalten. Durch die Stimulation von TNF- α wurde eine erhöhte Expression von CD54 induziert. Die heterogene Verteilung von CD54 innerhalb der ECFCs blieb erhalten und die stärkste Expression von CD54 wurde weiterhin auf den CD34 positiven Zellen nachgewiesen.

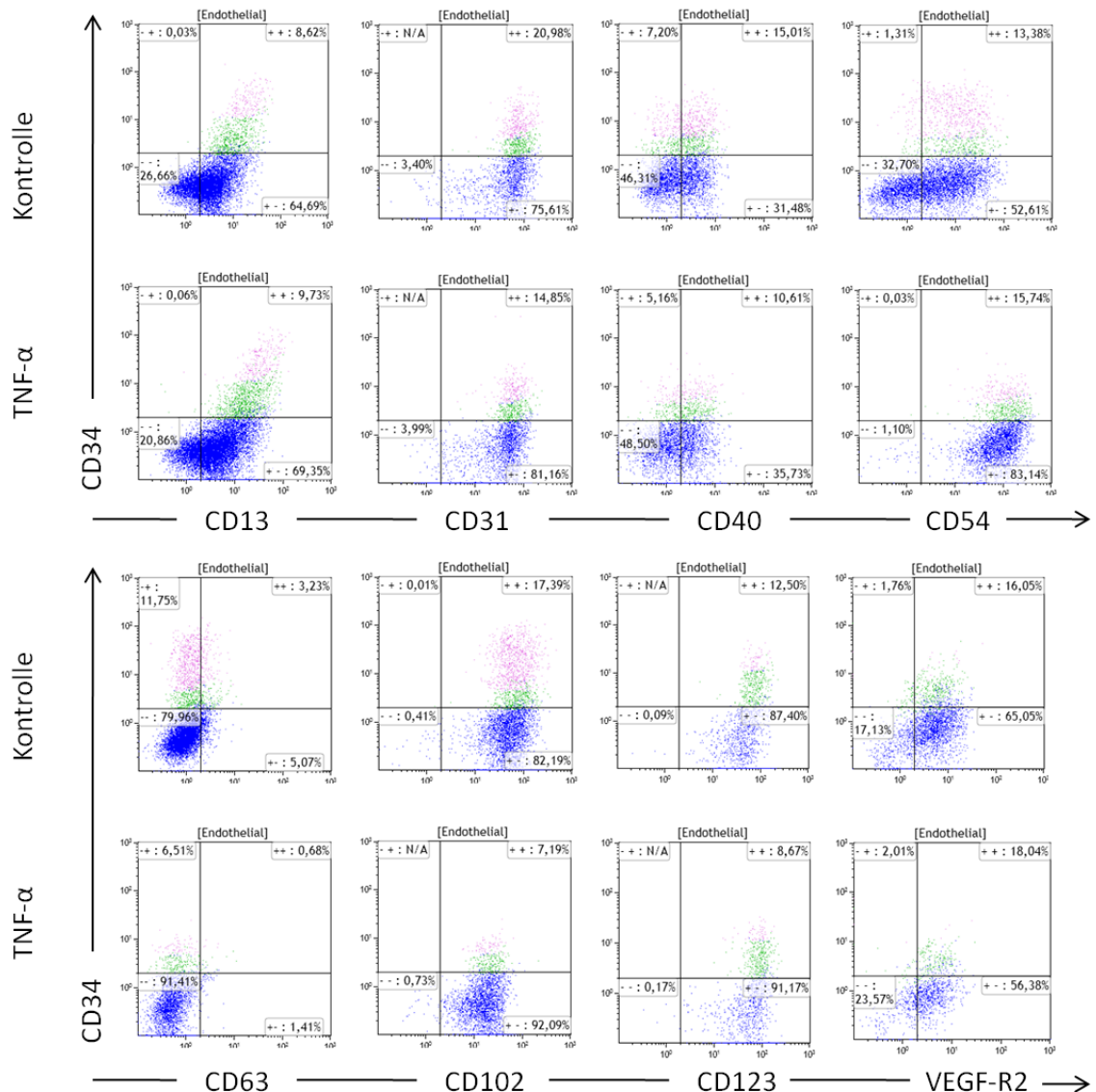


Abb. 18 : Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe 1 nach Aktivierung mit TNF- α .

Vergleich der Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe 1 (CD13, CD31, CD40, CD54, CD63, CD102, CD123 und dem VEGF-R2) an unbehandelten und TNF- α stimulierten ECFCs. Nach Behandlung der ECFC-Linie mit TNF- α wurde die Oberflächenexpression von CD54 auf allen Zellen hochreguliert, wohingegen CD102 verringert auf der Zelloberfläche exprimiert wurde.

Aus Gruppe 2 (CD44, CD146, CD151, CD166, CD252) wurde die Expression der Oberflächenproteine im unbehandelten und durch TNF- α stimulierten Zustand verglichen. Es war kein Unterschied zwischen den unbehandelten und der durch TNF- α stimulierten ECFC-Linien in Bezug auf deren Expression der Oberflächenproteine CD44, CD146, CD151 und CD166 erkennbar (Abb. 19).

Eine ähnliche Verschiebung der Expressionsstärke, wie es bei CD54 aus der Gruppe1 beschrieben wurde, trat in Gruppe2 für die Expression des Oberflächenproteins CD252 auf. Durch Stimulation mit TNF- α wurde eine erhöhte Expression der CD252 exprimierenden Zellen induziert. Die heterogene Verteilung von CD252 innerhalb der ECFCs blieb nach Aktivierung erhalten. Weiterhin exprimierten die CD34 negativen Zellen am stärksten CD252.

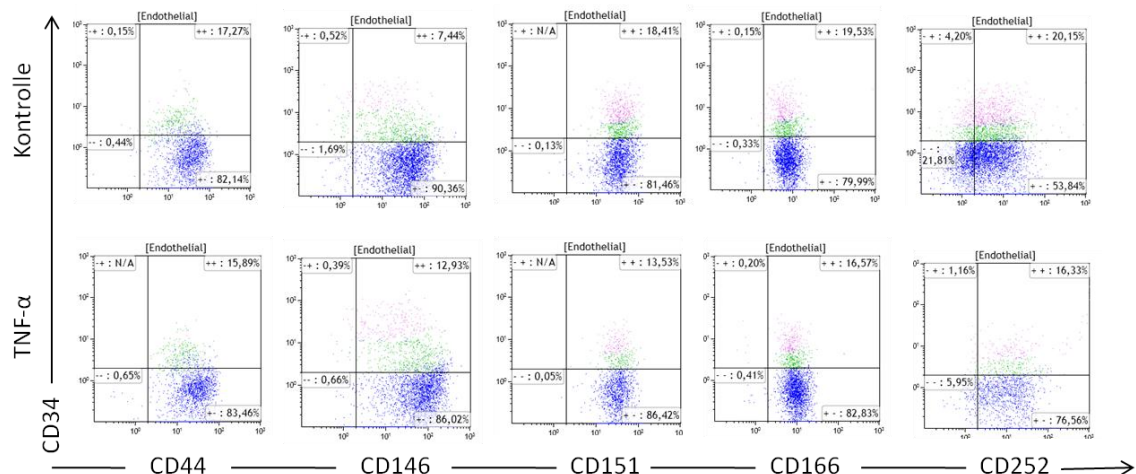


Abb. 19 : Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe 2 nach Aktivierung mit TNF- α .

Vergleich der Expression der Oberflächenproteine aus Gruppe2 (CD44, CD146, CD151, CD166 und CD252) an unbehandelten und TNF- α stimulierten ECFCs. Nach Behandlung der ECFC-Linie mit TNF- α wurde die Oberflächenexpression von CD252 auf den Zellen hochreguliert.

Nach Aktivierung der Zellen durch TNF- α blieb die heterogene Verteilung der Oberflächenmarker der Gruppen 1 und 2 erhalten. Dies lässt den Schluss zu, dass die für diese Marker gefundene Heterogenität nicht auf unterschiedliche Aktivierungszustände zurück zuführen ist. Somit konnte die beschriebene Heterogenität in der Markerexpression von CD13, CD34, CD31, CD40, CD44, CD54, CD63, CD123, CD146, CD151, CD166, CD252 und VEGF-R2 weiterhin mit dem Bestehen einer hierarchischen Entwicklung von verschiedenen Progenitoren begründet werden.

3.4 Hierarchische Auftrennung endothelialer Vorläuferzellen durch die Oberflächenantigene CD44 und CD34

Verschiedene Subfraktionen innerhalb einer ECFC-Linie unterschieden sich am deutlichsten durch die Expression der Oberflächenantigene CD34 und CD44. Die Subpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ konnten sowohl durchflusszytometrisch (Abb. 20-A) als auch durch extrazelluläre Färbungen dargestellt werden (Abb. 20-B).

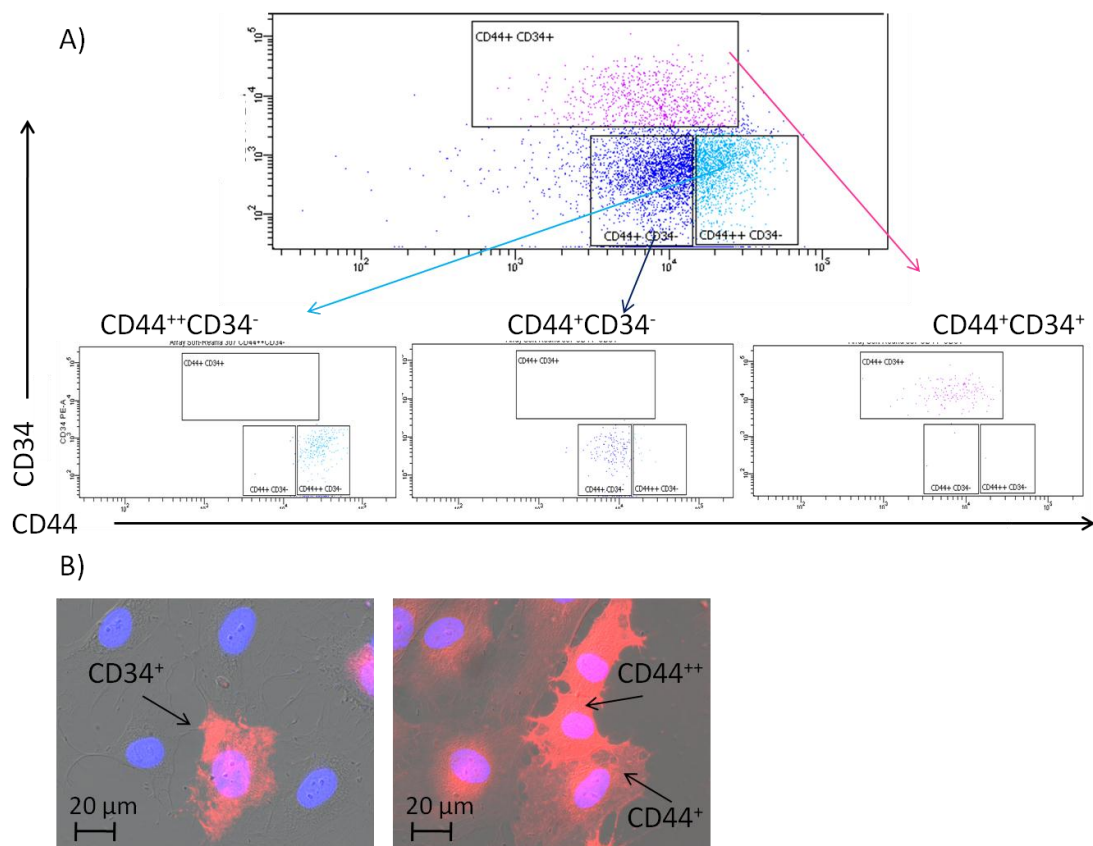


Abb. 20: Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD44 auf ECFCs.

(A) Darstellung der Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Separation der Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$ (hell blau), $CD44^{+}CD34^{-}$ (dunkel blau) und $CD44^{+}CD34^{+}$ (rosa). Die Reinheit der separierten Zellfraktionen wurde durch eine Re-Analyse gemessen. **(B)** Repräsentative Abbildung immunzytochemisch extrazellulär gegen die Oberflächenproteine von CD34 (links) und CD44 (rechts) gefärbter ECFCs, Phasenkontrast. Wenige Zellen exprimieren CD34. Einteilung von CD44 aufgrund der unterschiedlichen Expressionsstärken in $CD44^{+}$ und $CD44^{++}$.

Zur Analyse der hierarchischen Entwicklung der $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktionen wurden durchflusszytometrisch jeweils 5.000 Zellen voneinander separiert und die Oberflächenexpression von CD34 und CD44 in deren Nachkommenschaft durchflusszytometrisch an Tag 7 und Tag 14 nach Separation bestimmt (n=3).

Die Nachkommenschaft der separierten $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion bestand an Tag 7 und Tag 14 aus $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen, $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen (Abb. 21-A). Aus der ursprünglich abgelegten $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion entstanden $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen, $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen (Abb. 21-B). Nach Ablage der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen konnten nach 7 und 14 Tagen hauptsächlich $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21-C). In der Nachkommenschaft der ursprünglich abgelegten $CD44^{+}CD34^{+}$ Population entwickelten sich, im Vergleich zu der Nachkommenschaft der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen und $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen, der größte Anteil an $CD34^{+}$ ECFCs an Tag 7 und Tag 14 (Abb. 21-C). Die geringste Expansion trat bei der Nachkommenschaft der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion auf.

Dem Model einer Hierarchie zur Folge, dürften die primitiveren $CD44^{++}CD34^{-}$ / $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen nicht aus der reiferen $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion heraus entstehen. Eine 100 % Reinheit der separierten Zellfraktion konnte nicht erzielt werden, weshalb der Nachweis von $CD44^{++}CD34^{-}$ / $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen innerhalb dieser Zellfraktion aus falsch sortierten $CD44^{++}CD34^{-}$ / $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen innerhalb der $CD44^{+}CD34^{+}$ sortierten Zellfraktion herrühren könnte.

Durch eine Massenzellablage konnte kein ersichtliches Verhältnis zwischen diesen drei Subpopulationen beschrieben werden, weshalb eine Notwendigkeit von Einzelzellablagen, die die Untersuchung individueller Zellen erlauben, bestand.

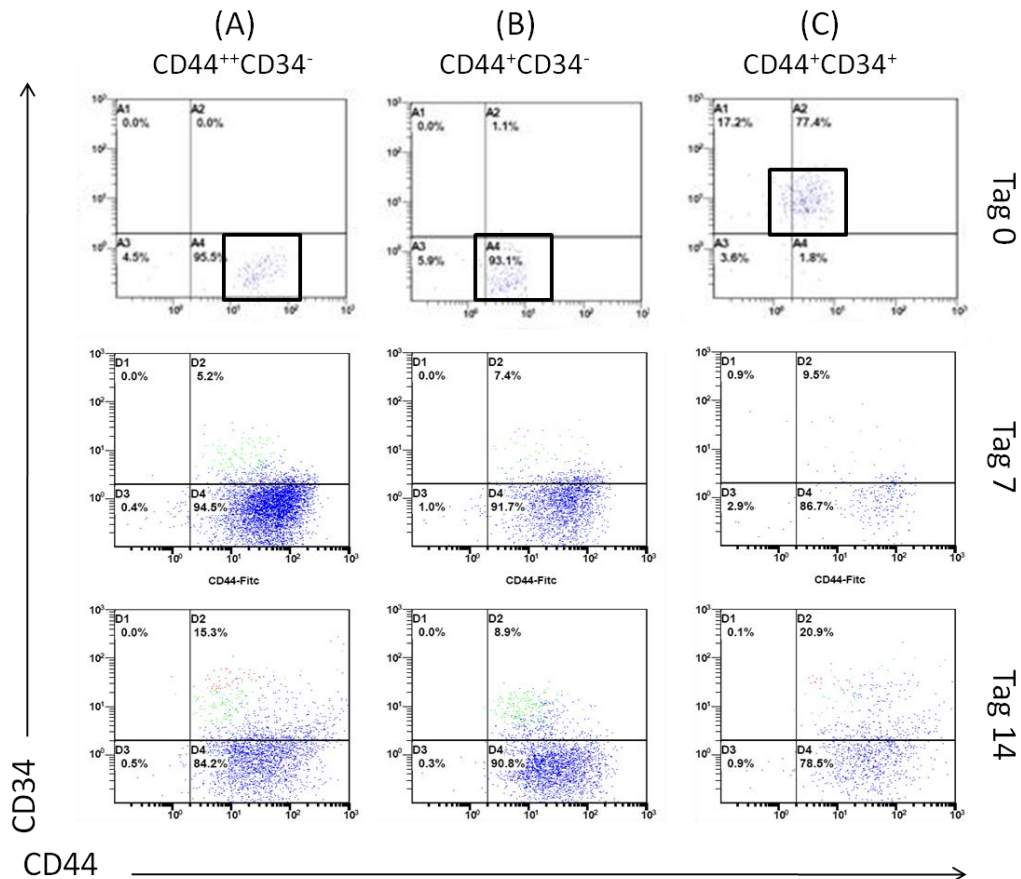


Abb. 21 : Oberflächenexpression von CD34 und CD44 auf der Nachkommenschaft separierter CD44⁺⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁻ und CD44⁺CD34⁺ Zellen.

Repräsentative Darstellung durchflusszytometrisch separierter CD44⁺⁺CD34⁻ (A), CD44⁺CD34⁻ (B) und CD44⁺CD34⁺ (C) ECFCs. Durchflusszytometrische Quantifizierung der Oberflächenexpression von CD34 und CD44 in deren Nachkommenschaft an Tag 7 und Tag 14 nach Separation. Eine Umwandlungsfähigkeit der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion zur CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion und umgekehrt wurde beobachtet. Das geringste Proliferationspotential und die höchste Anzahl CD34⁺ ECFCs wurde in der Nachkommenschaft der CD44⁺CD34⁺ Subpopulationen detektiert.

Nach mikroskopischer Betrachtung der Morphologie der separierten CD44⁺⁺CD34⁻ Zellen, CD44⁺CD34⁻ Zellen und CD44⁺CD34⁺ Zellen befand sich innerhalb der CD44⁺CD34⁺ abgelegten Zellfraktion ein erhöhter Anteil an mehrkernigen Zellen (Abb. 22-A). Die Verteilung von mehrkernigen Zellen in diesen drei Subpopulationen wurde drei Stunden nach durchflusszytometrischer Separation von jeweils 1000 Zellen mikroskopisch analysiert (n=4, Abb. 22-B). Im Mittel lag eine höhere Anzahl mehrkerniger Zellen in der CD44⁺CD34⁺ Zellfraktion (29,9 %, ± 8,24 %) im Vergleich zu der CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion (4,6 %, ± 0,81 %, p=0,010) und der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion (4,9 %, ± 3,8 %, p=0,012) vor.

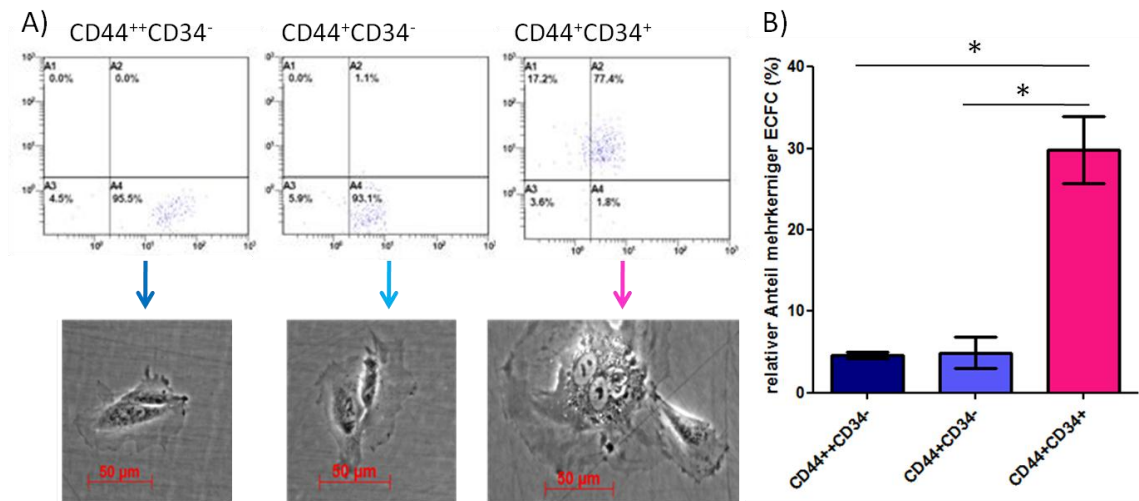


Abb. 22 : Verteilung mehrkerniger ECFCs in den drei Subpopulationen CD44⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁻ und CD44⁺CD34⁺.

(A) Darstellung separierter Subpopulationen anhand repräsentativer Beispiele; **(B)** Darstellung der prozentualen Anteile von mehrkernigen ECFCs in den drei Subpopulationen CD44⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁻ und CD44⁺CD34⁺; $p \leq 0,050$ wurden durch ein * markiert (p -Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

3.4.1 Anreicherung mehrkerniger endothelialer Vorläuferzellen

Ein erhöhter Anteil mehrkerniger ECFCs konnte mit dem Anstieg der Kultivierungsdauer beobachtet werden.

Es stellte sich die Frage, ob durch eine Anreicherung der mehrkernigen Zellen mögliche neue Kandidaten zur Beschreibung reifer/differenzierter ECFCs durch durchflusszytometrische Analysen dieser Zellen ermöglicht wird.

3.4.1.1 Durchflusszytometrische Darstellung mehrkerniger ECFCs

Durchflusszytometrisch kann der Gehalt von DNA durch DNA-interkalierende Farbstoffe wie Propidiumiodid (PI), welche stöchiometrisch an doppelsträngige DNA binden, in den zu analysierenden Zellen dargestellt werden (Krishan, 1975). Wird eine mit PI inkubierte Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert, ist es aufgrund der stöchiometrischen Bindung von PI an doppelsträngige DNA möglich, die Zellen den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend dem unterschiedlichen Gehalt an DNA zuzuordnen. Zweikernige Zellen, von denen jeder Kern einen diploiden Satz an Chromosomen enthält, würden somit den gleichen Gehalt an DNA aufweisen wie

mitotische Zellen. Hingegen würden Zellen mit zwei Kernen während der Mitose einen vier- (wenn ein Kern tetraploid ist) bzw. acht- (wenn beide Kerne tetraploid sind) fachen DNA Gehalt aufweisen und somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal als die mononukleären mitotischen Zellen vermitteln. Bei Zellen mit mehr als zwei Kernen wird ein erhöhtes Fluoreszenzsignal durch den erhöhten DNA-Gehalt gemessen.

Mit PI-Färbungen konnten Zellen mit mehr als 2 Kernen aufgrund der erhöhten Interkalation von PI separat von den zweikernigen bzw. mitotischen Zellen (G2-Phase) dargestellt werden (Abb. 23).

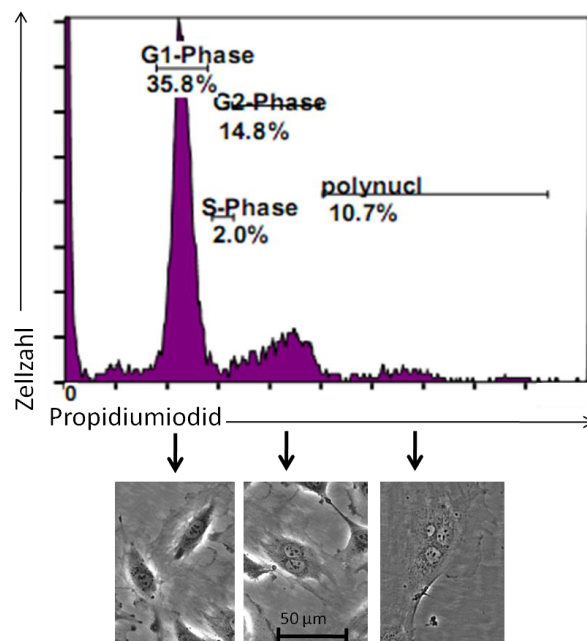


Abb. 23 : Propidiumiodid basierte Zellkernanalyse von ECFCs.

Anhand von Propidiumiodid basierter Messung des DNA-Gehalts von ECFCs wurden neben der G1-/S- und G2-Phase weitere DNA-Anreicherungen ersichtlich, die ECFCs mit mehreren Kernen darstellen könnten (=polynucl).

Da PI nur durch die perforierte Zellmembran von toten bzw. apoptotischen Zellen diffundieren kann, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringt, kann mittels PI keine Anreicherung von vitalen mehrkernigen Zellen erfolgen. Deshalb wurde nach Lebendkernfarbstoffen gesucht, die eine vergleichbare Auftrennung des DNA-Gehalts der Zellen ermöglichte.

3.4.1.2 Durchflusszytometrische Anreicherung mehrkerniger ECFCs

Um mehrkernige Zellen anzureichern, wurden die folgenden Lebendkernfarbstoffe verwendet.

Der Kernfarbstoff *Vybrant Dye-Ruby* (Invitrogen) ist membrandurchlässig, DNA-spezifisch und nicht fluoreszierend bis er an doppelsträngige DNA gebunden hat. Nach Applikation des *Vybrant Dye-Ruby* auf die Zellen wurde das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs im Zytoplasma und nicht im Kern nachgewiesen (Abb. 24-A). Das Fluoreszenzsignal des Lebendkernfarbstoff *Syto Blue* (Invitrogen) wurde, ähnlich wie das des *Vybrant Dye-Ruby*, im Zytoplasma von ECFCs und nicht im Kern nachgewiesen (Abb. 24-B). Das *Vybrant Dye-Ruby* und das *Syto Blue* waren deshalb für eine Lebendkernfärbung von ECFCs ungeeignet.

Mittels des Lebendkernfarbstoffs Hoechst 33324 konnte eine spezifische Kernfärbung von ECFCs erzielt (Abb. 24-C) und eine mögliche Auftrennung der mehrkernigen ECFCs durchflusszytometrisch dargestellt werden (Abb. 24-D).

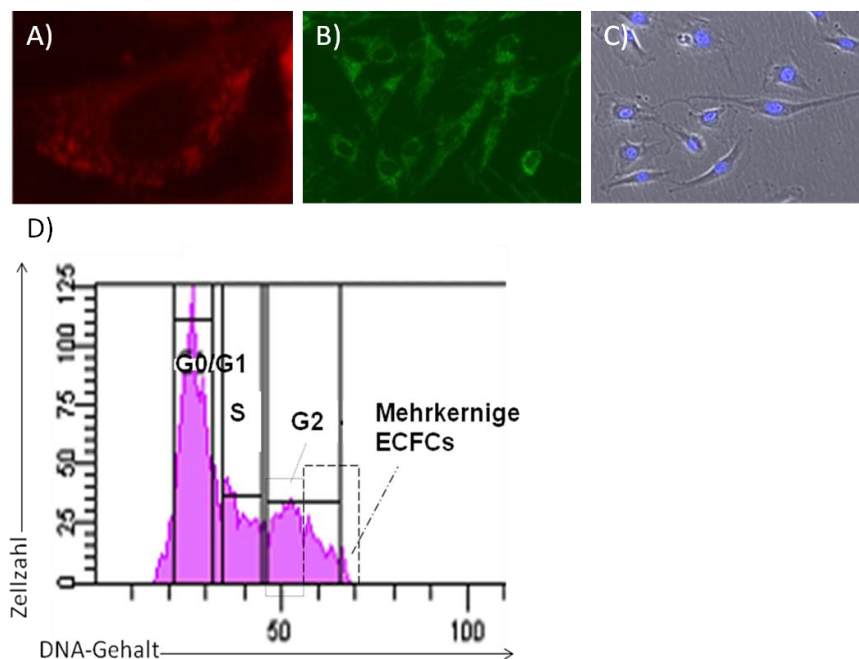


Abb. 24 : Färbungen mit den Kernfarbstoffen Vybrant Dye-ruby, Syto Blue und Hoechst 33324.

Die Farbstoffe Vybrant Dye-Ruby (A) und Syto Blue (B) färbten das Zytoplasma und nicht den Kern von ECFCs. Durch den Farbstoff Hoechst 33342 konnten die Kerne von ECFCs spezifisch angefärbt werden (C) und die Auftrennung des DNA-Gehalts der Zellen durchflusszytometrisch dargestellt werden (D).

Mittels Hoechst konnte keine Anreicherung von mehrkernigen Zellen erzielt werden, da keine ausreichende Auftrennung von mehrkernigen und sich in der G2-Phase befindenden Zellen möglich war. Hierzu konnte folgende Begründung von der Firma BD selbst, eingeholt werden: Der in diesen Versuchen verwendete FACSAria ist mit einer rechteckigen Küvette ausgestattet, wodurch es jedoch innen nicht zu einem runden Strömungsprofil für den Fluss der Zellen sondern zu einem elliptischen kommt. Für die Analyse von Zellen stellt dies kein Problem dar, da gleich am Eingang der Küvette gemessen wird, an dessen Stelle starke Kräfte herrschen, die die Zellen ausrichten. Beim Aria1 erfolgt diese Messung jedoch erst am Ende der Küvette, kurz vor der Nozzle. Hier herrschen nur noch wenige Kräfte, so dass die Zellen anfangen zu rotieren. Größere Zellen werden dann durch das elliptische Strömungsprofil abgebremst, wodurch nicht alle Zellen ideal ausgerichtet von dem Laser getroffen werden, was für Zellzyklusmessungen (Messungen des DNA-Gehalts) eine Voraussetzung darstellt.

Mit keinem der verwendeten Lebendkernfarbstoffe wurden mehrkernige ECFCs erfolgreich angereichert, weshalb von einer Anreicherung dieser Zellen im Rahmen dieser Arbeit abgesehen wurde.

3.4.2 Einzelzellablagen

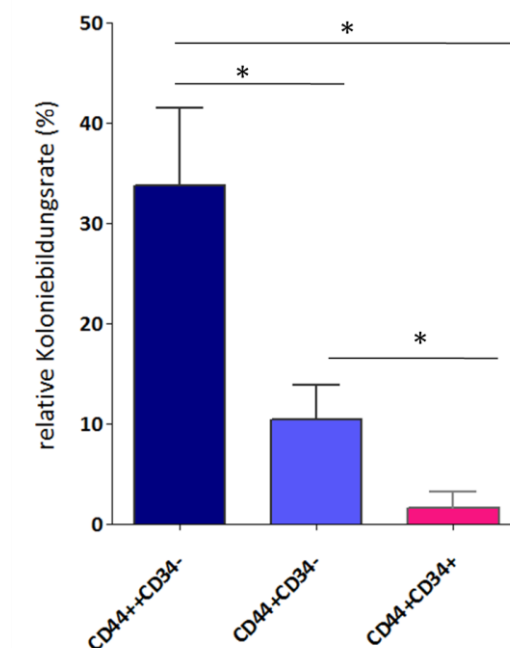
Der Hypothese folgend, dass primitivere ECFCs ein höheres Potential besitzen Kolonien auszubilden als reifere ECFCs, wurden einzelne Zellen der drei Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ durchflusszytometrisch abgelegt. Die Anzahl der Kolonien pro Platte sowie deren jeweilige Größe gab so retrospektiv Rückschlüsse darauf, welches Koloniebildungspotential die jeweilig sortierte Zelle im Mittel hatte.

Hierbei zeigte sich, dass die $CD44^{++}CD34^{-}$ abgelegten Zellen im Vergleich zu den $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen im Mittel ein 3 mal so hohes Koloniebildungspotential besaßen (Tab. 9, Abb. 25). Im Vergleich zu den $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen wiesen die $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen sogar ein 20-fach so hohes koloniebildendes Potential auf (Tab. 9, Abb. 25).

Tab. 9 : Relatives Koloniebildungspotential einzeln abgelegter ECFCs (%).

MW=Mittelwert; STABW=Standardabweichung; p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺
ECFC 1	30,21	9,37	0,00
ECFC 2	34,38	9,37	2,08
ECFC 3	28,13	15,63	0,01
ECFC 4	46,88	6,25	2,60
ECFC 5	29,17	11,46	3,65
MW	33,75	10,42	1,67
STABW	7,71	3,46	1,62
T-Test p=		0,008	0,001 0,011
			CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻ CD44 ⁺ CD34 ⁻

**Abb. 25 : Relative Kolonienanzahl einzeln abgelegter ECFCs an Tag 7.**

In fünf unabhängigen Versuchen zeigten die CD44⁺⁺CD34⁻ Zellen das höchste Koloniebildungspotential (33,75 % ± 7,71 %). Die einzeln abgelegten CD44⁺CD34⁺ Zellen zeigten mit 1,67 % (± 1,62 %) koloniebildenden Zellen kaum Wachstum auf; p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt und p-Werte < 0,05 durch *markiert.

Die einzeln abgelegten CD44⁺CD34⁺ Zellen zeigten kein Wachstum, weshalb sie unter diesen Versuchsbedingungen nicht zu Analysezwecken verwendet werden konnten.

3.5 Verbesserung der Kulturbedingungen für die klonale Expansion von ECFCs

Da initiale Versuche einzelne Zellen (insbesondere der Zellfraktion CD44⁺CD34⁺) zu Analysezwecken zu expandieren scheiterten, wurde versucht, eine verbesserte Expansion durch optimierte Kulturbedingungen zu erzielen.

3.5.1 Analyse verschiedener Matrices zur Kultivierung von endothelialen Vorläuferzellen

Komponenten der extrazellulären Matrix wurden zur Beschichtung der Zellkulturschalen verwendet, da diese Einfluss auf das Migrations- (Madri and Stenn, 1982) und Proliferationsverhalten (Gospodarowicz et al., 1980) von Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* ausüben. Endotheliale Vorläuferzellen wurden auf folgenden Komponenten der extrazellulären Matrix kultiviert und ihr Einfluss auf die Expansion der Zellen untersucht: Kollagen IV, Gelatine, Heparin, Hyaluronsäure (HA), Laminin und Fibrin. Der Einfluss von Zellkulturgefäßen aus modifiziertem Polystyrol (A-TCPS) auf ECFCs wurde ebenfalls getestet, dessen modifizierte Oberfläche speziell für ein verbessertes Wachstum von Primärzellen entwickelt wurde.

Adhärenz und Apoptoserate von ECFCs auf verschiedenen Matrices

Das Adhärenz von Zellen an die extrazelluläre Matrix stellt die Grundlage für das Überleben und Proliferieren der Zelle dar (Zhao et al., 2012). Das Adhäsionsverhalten von ECFCs auf verschiedenen Matrices wurde nach 15 min und 24 h bewertet. Die Anzahl von bereits adhärenz Zellen, sich noch in Suspension befindenden Zellen und apoptotischen Zellen wurde ermittelt. In vier unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach 15 min nur 1-5 Prozent der ECFCs auf allen Matrices adhärenz wurden [TCPS (2,91 % ± 3,13 %), Kollagen (4,47 % ± 3,27 %), Gelatine (1,51 % ± 1,19 %), Fibrin (1,71 % ± 1,49 %), HA (1,89 % ± 1,31 %), Laminin (3,49 % ± 4,99 %) und PL (0,89 % ± 1,55 %)] (Abb. 26). Eine Ausnahme stellten die ECFCs dar, welche auf A-TCPS (27,4 % ± 7,26 %) und Heparin (19,5 % ± 16,92 %) kultiviert wurden (Abb. 26). Nach 24 h wurden 81-92 Prozent der ECFCs auf TCPS (87,89 % ± 10,28 %), Kollagen (91,83 % ± 4,18 %), Gelatine (89,75 % ± 4,39 %), HA

(84,07 % \pm 7,99 %) und Laminin (81,17 % \pm 6,71 %) adhären. Mit 55,90 % (\pm 14,7 %) adhären ECFCs auf Fibrin und 0,00 % (\pm 0,00 %) adhären Zellen auf PL, wurde hier die geringste Anzahl an adhären Zellen beobachtet. Der höchste Anteil adhärenter ECFCs mit 92,61 % (\pm 1,91 %) konnte nach einer Kultivierung auf dem A-TCPS festgestellt werden (Abb. 26). Die meisten apoptotischen Zellen (88,30 % \pm 10,05 %) wurden auf den mit PL-beschichteten Platten und die wenigsten apoptotischen Zellen auf dem A-TCPS detektiert ($< 0,1$ % \pm 0,13 %). Somit zeigten die ECFCs, welche auf A-TCPS kultiviert wurden, eine höhere Adhärenz als die Zellen, welche auf TCPS_{15min} (p=0,006), Kollagen_{15min} (p=0,049), Gelatine_{15min} (p=0,012), Fibrin_{15min} (p=0,008) und Fibrin_{24h} (p=0,0017), HA_{15min} (p=0,011), Laminin_{15min} (p=0,009) und Laminin_{24h} (p=0,045) sowie PL_{15min} (p=0,005) und PL_{24h} (p < 0,001) kultiviert wurden. Ebenfalls zeigten diese Zellen nach 24 h eine signifikant niedrigere Apoptoserate als ECFCs, welche auf Fibrin (p=0,038) und PL (p < 0,001) kultiviert wurden (Abb. 26).

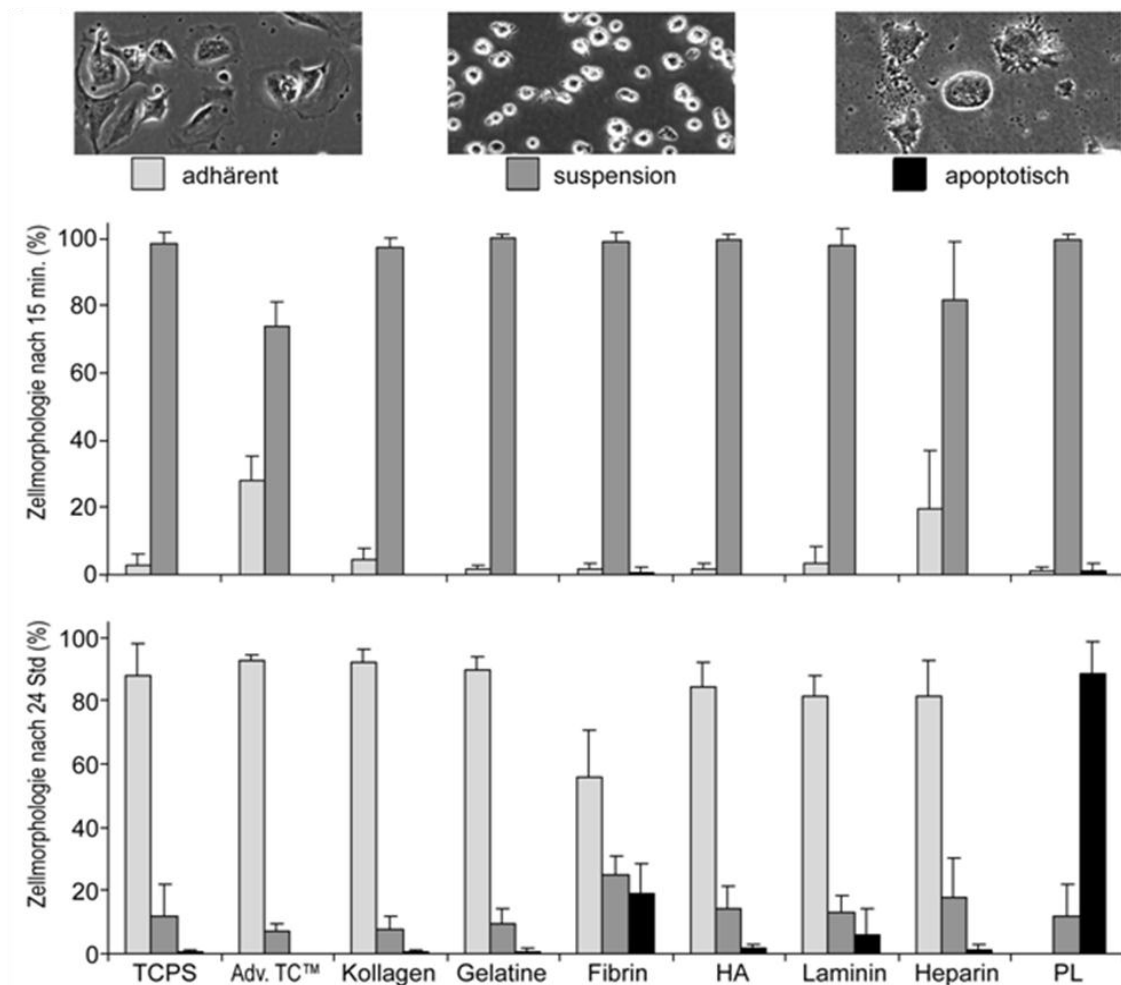


Abb. 26 : Quantifizierung von ECFCs nach Kultivierung auf unterschiedlichen Matrices.

Quantifizierung adhärenter ECFCs auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen, Gelatine, Fibrin, Hyaluronsäure, Laminin, Heparin und PL) im Vergleich zum Standard-TCPS und dem modifizierten Advanced-TCPS (Adv.-TC) ($n=4$). Die Morphologie der Zellen wurde in suspensions-, adhärenent- und apoptotische Zellen unterteilt und nach 15 min (oben) als auch nach 24 h (unten) dokumentiert.

Metabolische Aktivität von endothelialen Vorläuferzellen, kultiviert auf verschiedenen Matrices

Davon ausgehend, dass proliferierende Zellen eine erhöhte metabolische Aktivität als nicht proliferierende Zellen aufweisen, wurde die metabolische Aktivität der auf verschiedenen Matrices kultivierten Zellen gemessen und mit der von Zellen verglichen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden.

Um die metabolische Aktivität der endothelialen Vorläuferzellen auf den verschiedenen Matrices zu vergleichen wurden ECFCs in sechs Replikaten auf diesen

ausplattiert und deren metabolische Aktivität nach 24 h mit einem entsprechenden Verfahren ermittelt (n=4) (siehe 2.2.6.7).

Im Vergleich zu den auf TCPS kultivierten ECFCs ($1 \% \pm 0,0 \%$), wurde insbesondere bei den auf Gelatine ($1,09 \% \pm 0,37 \%$) und Heparin ($1,06 \% \pm 0,25 \%$) kultivierten ECFCs eine leicht ($p_{\text{Gelatine}}=0,67$ und $p_{\text{Heparin}}=0,25$) sowie bei den auf A-TCPS ($1,79 \% \pm 0,28 \%$) kultivierten ECFCs eine signifikant erhöhte ($p_{\text{A-TCPS}}=0,011$) metabolische Aktivität nachgewiesen (Abb. 27).

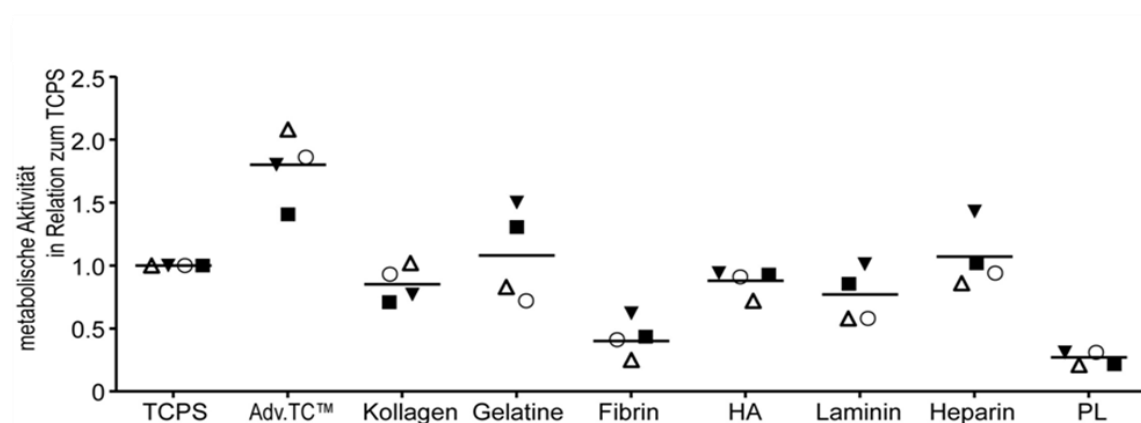


Abb. 27 : Metabolische Aktivität von ECFCs nach Kultivierung auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix.

Darstellung der metabolischen Aktivität von ECFCs nach 24 h Kultivierung auf den verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix in Relation zum TCPS (n=4). Zur Kennzeichnung der verwendeten ECFC Kolonie (1-4) wurde jeweils ein Symbol verwendet. Der Mittelwert wird durch einen — dargestellt.

Zusammenfassend wurde eine erhöhte metabolische Aktivität einhergehend mit einer reduzierten Apoptoserate der ECFCs durch eine Kultivierung dieser auf A-TCPS erzielt, womit sich dieses als das geeignetste Material für die Kultivierung von ECFCs herausstellte.

3.5.2 Effekt von Medien auf die Expansion von ECFCs

Der Ersatz von fötalem Rinderserum durch humanes Plättchenlysat im Medium, bewirkt eine erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit von Endothelzellen und setzt deren zum Anwachsen erforderliche Dichte herab (Hofmann et al., 2009; Reinisch et al., 2009).

Das in den Zusätzen für das EGM-2 enthaltene FBS (siehe 2.2.2.1) wurde durch zwei, fünf und zehn Prozent PL ersetzt und die resultierenden Einflüsse auf die Apoptoserate, die metabolische Aktivität und die Vermehrungsrate von ECFCs mit 2 % FBS verglichen.

Nach dem Austausch von 2 % FBS gegen 2 % PL konnte eine verminderte Apoptoserate der kultivierten ECFCs von 48 % ($\pm 0,26$ %, $p=0,055$) beobachtet werden (Abb. 28-A oberer Teil). Dieser Effekt wurde durch eine Konzentrationserhöhung des PL verstärkt, durch den die Apoptoserate der ECFCs bei 5 % PL um 71 % ($\pm 0,095$ %, $p=0,001$) und bei 10 % PL um 76 % ($\pm 0,03$ %, $p< 0,001$) vermindert gemessen wurde. Die vergleichsweise niedrigsten Apoptoseraten wurden bei den ECFCs gemessen, die auf A-TCPS kultiviert wurden [bei 2 % PL wurde eine verminderte Apoptoserate um 60 % ($\pm 0,16$ %, $p=0,004$), bei 5 % PL um 80 % ($\pm 0,13$ %, $p=0,002$) und bei 10 % PL um 89 % ($\pm 0,06$ %, $p< 0,001$)]. Der Austausch von FBS durch 10 % PL spiegelte die niedrigste Apoptoserate wieder ($n=4$, Abb. 28-A oberer Teil).

Im Vergleich zu den auf TCPS kultivierten ECFCs ($1\% \pm 0,00$ %) wurde eine geringere metabolische Aktivität der Zellen durch die Kultivierung mit PL (2 % PL $0,67\% \pm 0,40$ %; 5 % PL $0,82\% \pm 0,31$ % und 10 % PL $0,57\% \pm 0,14$ %) festgestellt (Abb. 28-A unterer Teil). Ähnliche Ergebnisse zeigten die auf A-TCPS mit EGM-2 PL versetzten Medium kultivierten ECFCs (2% PL $0,89\% \pm 0,39$ % und 10 % PL $0,81\% \pm 0,22$ %) mit der Ausnahme der in 5 % PL Medium kultivierten ECFCs ($1,07\% \pm 0,25$ %), die eine erhöhte metabolische Aktivität aufwiesen (Abb. 28-A unterer Teil).

Zusammenfassend wurde bei den ECFCs, die auf A-TCPS in EGM-2 5 % PL kultiviert wurden, die höchste metabolische Aktivität als auch eine stark erniedrigte Apoptoserate gemessen.

Um den Einfluss auf die Vermehrungsrate der ECFC durch die optimierte Kulturbedingung (A-TCPS mit EGM-2 5 % PL) im Vergleich mit der Standardbedingung (TCPS mit EGM-2 2 % FBS) zu vergleichen, wurden fünf verschiedene ECFCs unter diesen beiden Bedingungen kultiviert.

Die ECFCs, die in den Standardbedingungen kultiviert wurden, teilten sich im Mittel 24,39-mal ($\pm 3,43$). Die ECFCs, die in den optimierten Bedingungen kultiviert wurden,

teilten sich im Mittel 34,94-mal ($\pm 5,02$; $p=0,004$; $n=5$) (Abb. 28-B). Ein ähnlicher Effekt wurde für die ECFCs beobachtet, welche auf A-TCPS in EGM-2 10 % PL kultiviert wurden (34,55 Zellteilungen; $\pm 2,65$; $p=0,001$; $n=5$). Umgekehrt, teilten sich die ECFCs, die in EGM-2 2 % PL kultiviert wurden weniger häufig [(2 % PL_{TCPS} 16,14 Zellteilungen; $\pm 2,59$; $p=0,018$); (2 % PL_{A-TCPS} 21,63 Zellteilungen; $\pm 1,68$ %; $p=0,048$)] (Abb. 28-B).

Nachdem durch die veränderten Kulturbedingungen eine erhöhte Proliferation und eine erniedrigte Apoptoserate der ECFCs erzielt wurde, sollte das ursprüngliche Ziel der Verbesserung der Kulturbedingungen, nämlich eine erhöhte Expansion einzeln abgelegter ECFCs, untersucht werden. Hierfür wurden erneut Einzelzellablagen von ECFCs durchgeführt und dessen koloniebildendes Potential an Tag 7 nach Einzelzellablage untersucht.

Die auf den Standardbedingungen kultivierten ECFCs zeigten ein Koloniebildungspotential von 30,21 % ($\pm 1,80$ %). Eine im Mittel erhöhte Frequenz der relativen Koloniebildung wurde bei den ECFCs detektiert, die auf A-TCPS in EGM-2 5 % PL kultiviert wurden (53,65 %; $\pm 10,25$ %; $p=0,027$; $n=4$) (Abb. 28-C). Darüber hinaus, zeigten diese Zellen in vier unabhängigen Versuchen eine erhöhte Koloniengröße im Vergleich zu den unter den Standardbedingungen kultivierten ECFCs (Tab. 10). Im Gegenteil zu den auf A-TCPS 5 % PL kultivierten Zellen bildeten sich unter den Standardbedingungen kaum Kolonien mit einer Größe von mehr als 1000 Zellen (Abb. 28-C).

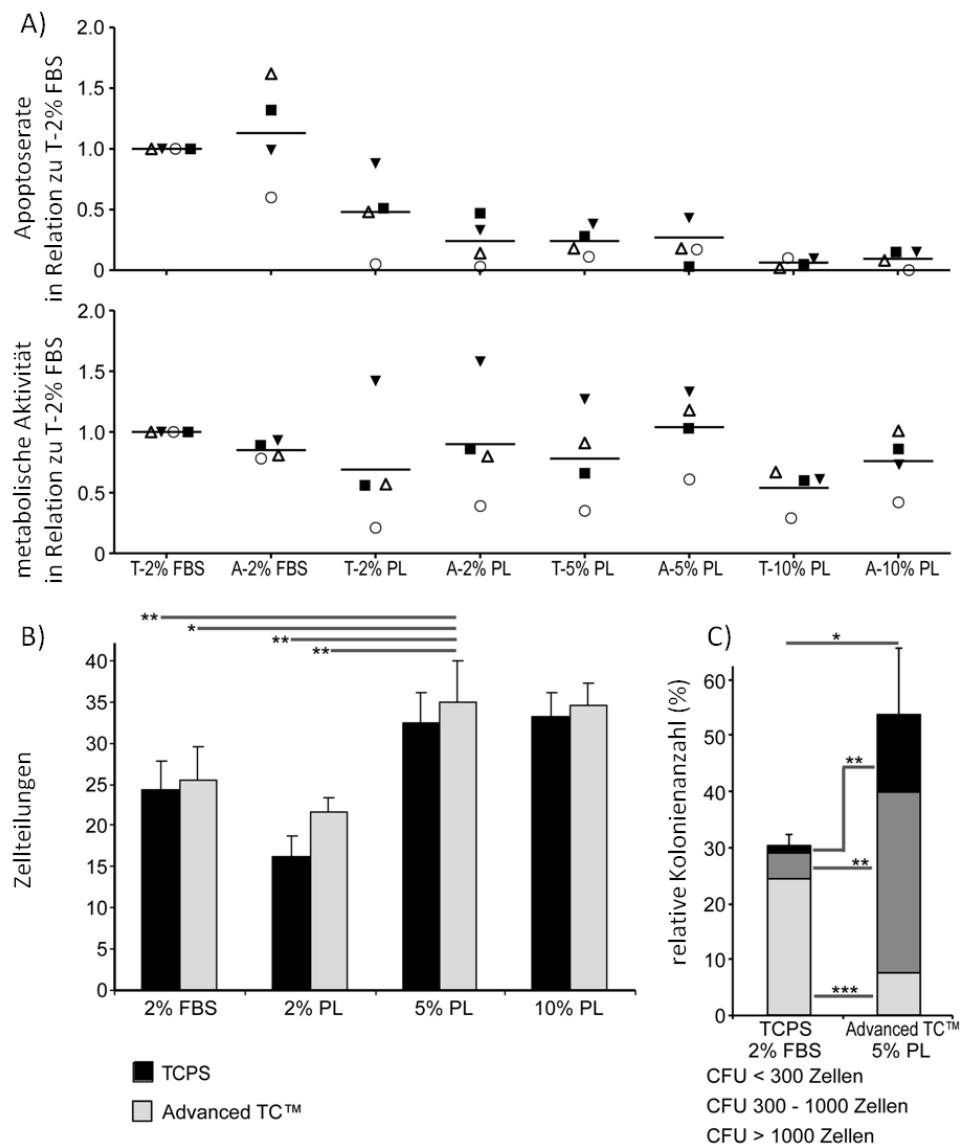


Abb. 28 : Einfluss von PL auf die Apoptoserate, die metabolische Aktivität und das Koloniebildungspotential von ECFCs.

(A) Apoptose- (obere Abb.) und metabolischer Aktivitätstest (untere Abb.) nach 24 h Kultivierung von ECFCs in EGM-2 Medium mit 2 % FBS oder 2 %, 5 % und 10 % PL auf TCPS oder A-TCPS (n=4). Mit dem Austausch von 2 % FBS gegen PL ging eine verminderte Apoptoserate einher; Zur Kennzeichnung der verwendeten ECFC Kolonie (1-4) wurde jeweils ein Symbol verwendet. Der Mittelwert wird durch einen — dargestellt. **(B)** Vergleich der Zellteilungen von ECFCs kultiviert auf TCPS oder A-TCPS in EGM-2 mit 2% FBS oder 2 %, 5 % und 10 % PL. Im Mittel teilten sich die ECFCs, die auf A-TCPS und in 5 % PL kultiviert wurden, am häufigsten (34,94 Zellteilungen; $\pm 5,02$; $p=0,004$; $n=5$) **(C)** Anzahl der von einzeln abgelegten ECFCs gebildeten Kolonien sowie deren Koloniegröße an Tag 7. Eine erhöhte Koloniebildungsrate wurde bei den ECFCs detektiert, die auf A-TCPS in EGM-2 5 % PL kultiviert wurden (53,65 %, $\pm 10,25$, $p=0,027$, $n=5$). Ebenso wurde bei diesen Zellen ein erhöhter Anteil an Kolonien bestehend aus mind. 1000 Zellen (13,88 %, $\pm 3,84$ %, $p=0,004$) im Vergleich zu den auf TCPS in EGM-2 2 % FBS kultivierten ECFCs (1,25 %, $\pm 1,04$ %, $n=5$) beobachtet.; T=TCPS; A=Advanced-TCPS; CFU: colony forming unit/Koloniebildungsrate; *= $p \leq 0,050$; **= $p \leq 0,001$; ***= $p \leq 0,005$ (p-Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

Tab. 10 : Koloniegrößen der von ECFCs gebildeten Kolonien unter Standard- und optimierten Bedingungen an Tag 7 nach Einzelzellablage.

p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt; n=4

Koloniegröße	Standardbedingung	Optimierte Bedingung	statistische Signifikanz (p=)
< 300 Zellen	24,25 % (\pm 1,50 %)	7,50 % (\pm 2,08 %)	<0,001
> 300 Zellen	4,75% (\pm 1,50 %)	32,25 % (\pm 6,40 %)	0,005
> 1000 Zellen	1,25 % (\pm 1,04 %)	13,88 % (\pm 3,84 %)	0,004

Aufgrund des Nachweises einer erhöhten metabolischen Aktivität, einer geringeren Apoptoserate sowie einer erhöhten Vermehrungsrate der unter den A-TCPS mit EGM-2 5 % PL kultivierten ECFCs wurden diese Kulturbedingungen für die ECFC-Kultivierung im weiteren Verlauf als optimierte Bedingung verwendet.

3.5.3 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von ECFCs kultiviert unter den Standard- und optimierten Bedingungen

Nachdem ECFC-Linien für 5 Passagen kultiviert worden waren, waren die unter A-TCPS mit 5 % PL kultivierten ECFCs im Vergleich zu den unter den Standardbedingungen kultivierten ECFCs, phänotypisch kleiner (Abb. 29-A, B). Ein Vergleich dieser Zellen in Passage 10 zeigte, dass die unter den Standardbedingungen kultivierten Zellen im Vergleich zu den unter den optimierten Bedingungen kultivierten proliferierenden Zellen phänotypisch groß sowie teilweise postmitotisch waren (Abb. 29-C, D). Diese phänotypisch größeren und postmitotischen Zellen entsprechen unserer Annahme nach differenzierten Zellen. Phänotypisch kleine Zellen entsprechen unserer Hypothese hingegen primitiven ECFCs. Somit würden die Zellen, die unter den optimierten Bedingungen kultiviert wurden, länger primitiv bleiben als diejenigen Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Dies unterstützt die Hypothese, dass ein erhöhtes Proliferationspotential der unter den optimierten Bedingungen kultivierten ECFCs von einer längeren Erhaltung der Primitivität dieser Zellen herrührt.

Durch den längeren Erhalt der Primitivität sollten keine Unterschiede in den funktionellen Eigenschaften AcLDL aufzunehmen, intrazellulär vWF anzusammeln und tubulärartige Struktur im Matrigel auszubilden, festzustellen sein. Da die Zellen in

Passage 5, kultiviert unter Standardbedingungen, phänotypisch demselben Differenzierungsstadium zugeordnet wurden, wie ECFCs in Passage 10, kultiviert unter optimierten Bedingungen, wurden ihre Eigenschaften miteinander verglichen.

Beide Zellfraktionen besaßen eine Ansammlung von intrazellulären vWF (Abb. 29-E, H), nahmen vergleichbar AcLDL auf (Abb. 29-F, I) und bildeten tubulärartige Struktur im Matrigel (Abb. 29-G, J).

Ein weiteres Kriterium der ECFCs stellt wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben ihre Aktivierbarkeit durch TNF- α dar, die durch eine erhöhte Expression von CD54, CD62E und CD106 auf aktivierten ECFCs dargestellt werden kann. Unter den optimierten Bedingungen langzeitkultivierte (56 Tage) ECFCs wurden auf ihre Sensitivität für das inflammatorische Zytokin TNF- α untersucht. Da nach Stimulation der ECFC-Linien mit TNF- α durchflusszytometrisch eine erhöhte Oberflächenexpression der Oberflächenantigene CD54, CD62E und CD106 exprimiert wurde, waren ECFCs auch nach Langzeitkultivierung durch das inflammatorische Zytokin TNF- α aktivierbar (Abb. 29-K).

Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Kultivierung der ECFCs unter den optimierten Kulturbedingungen nicht zu einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften führte, sondern die Primitivität der Zellen über einen längeren Zeitraum erhalten blieb. Für die folgenden Versuche wurden die verwendeten ECFC-Linien/HUVEC-Linien daher auf A-TCPS und in EGM-2/5 % PL kultiviert.

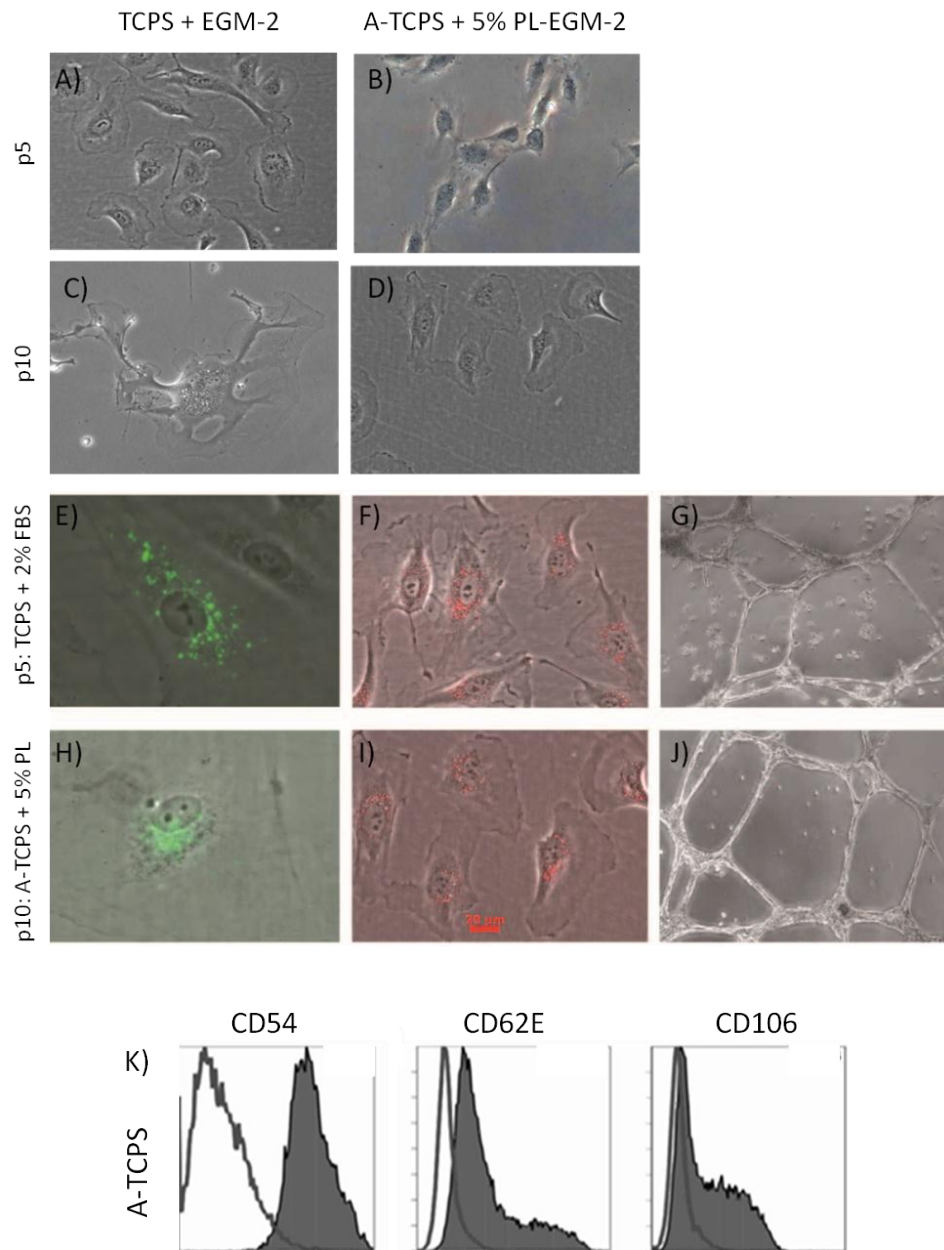


Abb. 29 : Vergleich der charakteristischen Eigenschaften von ECFCs kultiviert auf optimierten- und Standardkulturbedingungen.

Repräsentative Aufnahmen der Morphologie der unter TCPS/2 % FBS kultivierten ECFCs in p5 (**A**) und p10 (**C**) sowie den auf A-TCPS/5 % PL kultivierten ECFCs in p5 (**B**) und p10 (**D**) ($n=3$), 200-fache Vergrößerung, Phasenkontrast; Vergleich der funktionellen Eigenschaften von p5 TCPS/2 % FBS (**E-G**) mit p10 A-TCPS/5 % PL (**H-J**) kultivierten ECFCs: E+H=intrazelluläre Färbung des vWF (grün) (200-fache Vergrößerung, Phasenkontrast); F+I=Aufnahme von Ac-LDL (rot) (200-fache Vergrößerung, Phasenkontrast), G+J: Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel (50-fache Vergrößerung, Phasenkontrast); (**K**) Nachweis der Sensitivität für $\text{TNF-}\alpha$ von A-TCPS/5 % PL langzeitkultivierten (Tag 56) ECFCs über die Oberflächenexpression der Oberflächenproteine CD54, CD62E und CD106. Hierbei ist in weiß die Oberflächenexpression unbehandelter ECFCs sowie in grau die Oberflächenexpression nach Stimulation durch $\text{TNF-}\alpha$ dargestellt.

3.6 Analyse der Hierarchie von ECFCs unter optimierten Kulturbedingungen

3.6.1 Bestimmung des koloniebildenden Potentials durch Einzelzellablagen

Bei den unter Abschnitt 3.4 geschilderten Untersuchungen der Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ durch Massenzellseparation, konnte kein ersichtliches hierarchisches Verhältnis zwischen diesen drei Subpopulationen beschrieben werden. Zur weiteren Analyse wurden Einzelzellablagen untersucht. Der Hypothese folgend, dass primitivere ECFCs ein höheres koloniebildendes Potential besitzen als reifere ECFCs, wurden je untersuchter Zellfraktion 96 Einzelzellablagen durchflusszytometrisch in eine 96-Well Platte abgelegt. Die Anzahl der Kolonien pro Platte sowie deren jeweilige Größe gab so retrospektiv Rückschlüsse darauf, welches Koloniebildungspotential die jeweilig sortierte Zellfraktion im Mittel hatte. Die Dokumentation der gebildeten Kolonien erfolgte in Intervallen. Erste gebildete Kolonien wurden an Tag 3 dokumentiert, wodurch zum Einen den Zellen nach Einzelzellablage Zeit gegeben wurde zu sedimentieren und adhärent zu werden und zum Anderen die ersten 1-2 Teilungen der Zellen beobachtet werden konnten. An Tag 7 nach Einzelzellablage wurden bereits die ersten größeren Kolonien von den Zellen mit dem stärksten Proliferationspotential erfasst. Abschließend wurde nach 14 Tagen die Koloniebildungsrate mikroskopisch dokumentiert, wodurch auch von langsam teilenden Zellen gebildete Kolonien aufgezeichnet werden konnten.

In 7 unabhängigen Versuchen bildeten knapp ein Drittel der abgelegten $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen drei Tage nach Einzelzellablage erste Kolonien aus. Ein Fünftel der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen und ein Vierzehntel der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen bildeten zu diesem Zeitpunkt erste Kolonien aus (Abb. 30-A, Tab. 11). Nach sieben Tagen wiesen alle Zellfraktionen eine erhöhte Koloniebildungsrate auf. Die $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen wiesen im Mittel das höchste und die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen das geringste koloniebildende Potential auf (Abb. 30-B, Tab. 11). Die höchste Anzahl an gebildeten Kolonien wurde an Tag vierzehn nach Einzelzellablage in der Zellfraktion der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen detektiert (56,55 %; $\pm 14,95$ %). In der Zellfraktion der $CD44^{+}CD34^{-}$ bildeten 46,28 % ($\pm 13,90$ %) und in der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion 12,15 % ($\pm 11,23$ %) der Zellen Kolonien aus (Abb. 30-C, Tab. 11).

Zu allen dokumentierten Zeitpunkten wies die Zellfraktion der CD44⁺⁺CD34⁻ ECFCs das höchste und die CD44⁺CD34⁺ das geringste Proliferationspotential auf. Dies bestätigt die anfängliche Hypothese, dass die CD44⁺⁺CD34⁻ Zellen hierarchisch primitiver als die CD44⁺CD34⁺ Zellen sind. Die Beobachtung, dass ungefähr jede zweite CD44⁺⁺CD34⁻ ECFC Kolonien ausbildete, ließ annehmen, dass auch diese Population ein heterogenes Zellgemisch ist und aus primitiveren und reiferen Zellen besteht.

Tab. 11: Relatives Koloniebildungspotential von ECFCs an Tag 3, 7 und 14 nach Einzelzellablage (%).
MW=Mittelwert, STABW=Standardabweichung, p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt, n=7

Tag 3	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺	
ECFC 1	28,13	14,58	8,33	
ECFC 2	35,42	21,88	20,83	
ECFC 3	22,92	25,00	4,17	
ECFC 4	10,42	5,21	4,17	
ECFC 5	27,08	14,58	6,25	
ECFC 6	50,00	52,78	2,78	
ECFC 7	33,33	13,89	0,00	
MW	29,61	21,13	6,65	
STABW	11,24	14,19	6,28	
T-Test	p=	0,039	0,004	++/-
			0,067	+/-

Tag 7	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺	
ECFC 1	47,92	42,71	14,58	
ECFC 2	68,75	53,13	36,46	
ECFC 3	25,00	27,08	13,54	
ECFC 4	14,58	9,38	4,17	
ECFC 5	37,50	21,88	10,42	
ECFC 6	61,11	66,67	8,33	
ECFC 7	61,11	41,67	0,00	
MW	45,14	37,50	12,50	
STABW	18,80	18,06	10,87	
T-Test	p=	0,079	0,004	++/-
			0,013	+/-

Tag 14	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺	
ECFC 1	52,08	50,00	20,83	
ECFC 2	69,79	51,04	33,33	
ECFC 3	40,63	31,25	11,46	
ECFC 4	36,11	25,00	5,21	
ECFC 5	77,78	66,67	3,13	
ECFC 6	58,33	50,00	2,78	
ECFC 7	61,11	50,00	8,33	
MW	56,55	46,28	12,15	
STABW	14,95	13,90	11,23	
T-Test	p=	0,001	<0,001	++/-
			0,002	+/-

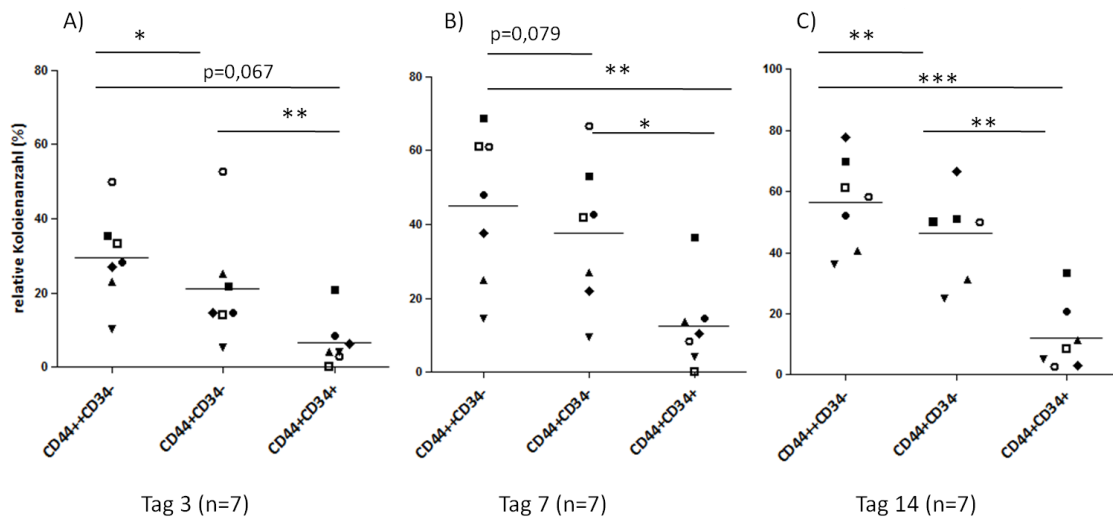


Abb. 30 : Relative Anzahl gebildeter Kolonien nach Einzelzellablage.

Darstellung der relativen Kolonienanzahl an Tag 3 (A), Tag 7 (B) und Tag 14 (C) nach Einzelzellablage (n=7). * = $p \leq 0,050$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$ (p-Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt); Zur Kennzeichnung der verwendeten ECFC Kolonie (1-7) wurde jeweils ein Symbol verwendet. Der Mittelwert wird durch einen — dargestellt.

Untersuchung der Koloniegroße. Der Arbeitshypothese zur Folge, dass primitivere ECFCs ein höheres Koloniebildungspotential als reifere ECFCs besitzen, wurde angenommen, dass diese Zellen auch ein erhöhtes Proliferationspotential aufweisen und dadurch größere Kolonien als die reiferen Zellen bilden.

Zur Untersuchung der Koloniegroße wurden die gebildeten Kolonien an Tag 14 in folgende Koloniegroßen unterteilt: S: 1-10 Zellen, M: 11-100 Zellen, L: 101-300 Zellen, XL: 301-1000 Zellen, XXL: 1001-10.000 Zellen und >XXL: > 10.000 Zellen.

Ein Vergleich der relativen Koloniegroßen der drei Subpopulationen CD44⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁺ und CD44⁺CD34⁺ untereinander zeigte, dass der größte Anteil an S (19 %), M (8 %), XXL (9 %) und >XXL (6 %) Kolonien in der Zellfraktion der CD44⁺CD34⁻ abgelegten Zellen zu finden waren (Abb. 31, Tab. 12). Dies bedeutet, dass sowohl die Zellen mit dem geringsten, als auch die Zellen mit dem höchsten Proliferationspotential in dieser Population nachgewiesen wurden. Auch dies deutete darauf hin, dass sich in der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion primitivere und reifere ECFCs befanden.

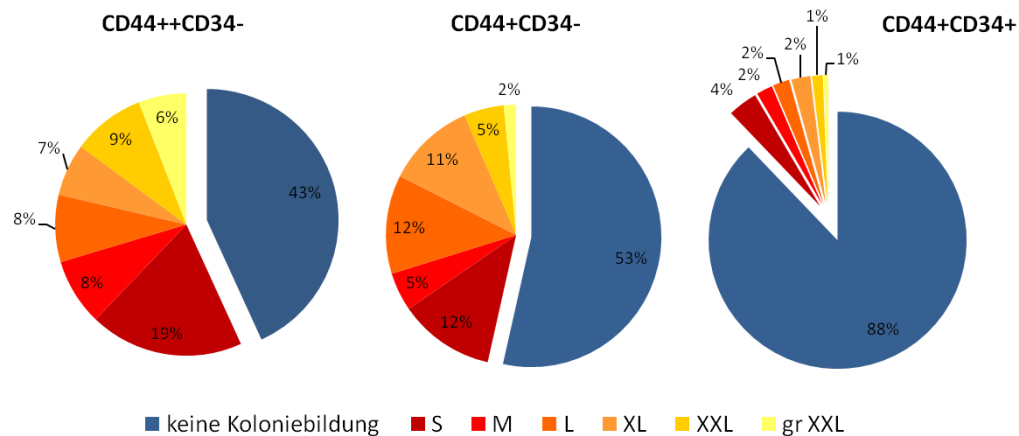


Abb. 31 : Verteilung der Koloniegrößen an Tag 14 nach Einzelzellablage.

Darstellung der relativen Anzahl der jeweiligen Koloniegröße S, M, L, XL, XXL und größer XXL sowie des Anteils an nicht gebildeten Kolonien; Die Aufteilung der Koloniegrößen erfolgte nach folgender Zellzahl: S: 1-10 Zellen, M: 11-100 Zellen, L: 101-300 Zellen, XL: 301-1000 Zellen, XXL: 1001-10.000 Zellen und >XXL: > 10.000 Zellen; n=7

Tab. 12 : Verteilung der Koloniegrößen an Tag 14 nach Einzelzellablage.

MW= Mittelwert; STABW= Standardabweichung

CD44++ CD34-	keine Koloniebildung [%]	S [%]	M [%]	L [%]	XL [%]	XXL [%]	gr XXL [%]
ECFC 1	47,92	13,54	14,58	6,25	6,25	8,33	3,13
ECFC 2	30,21	5,21	1,04	6,25	17,71	26,04	13,54
ECFC 3	59,38	26,04	6,25	4,17	2,08	1,04	0,00
ECFC 4	63,89	25,00	5,56	2,78	0,00	5,56	2,78
ECFC 5	22,22	38,89	11,11	13,89	8,33	5,56	0,00
ECFC 6	41,67	0,00	2,78	11,11	5,56	16,67	22,22
ECFC 7	38,89	25,00	16,67	13,89	5,56	0,00	0,00
MW	43,45	19,10	8,28	8,33	6,50	9,03	5,95
STABW	14,95	13,53	5,95	4,59	5,67	9,29	8,63

CD44+ CD34-	keine Koloniebildung [%]	S [%]	M [%]	L [%]	XL [%]	XXL [%]	gr XXL [%]
ECFC 1	50,00	12,50	4,17	16,67	11,46	2,08	3,13
ECFC 2	48,96	5,21	2,08	11,46	14,58	16,67	1,04
ECFC 3	68,75	10,42	5,21	5,21	7,29	2,08	1,04
ECFC 4	75,00	11,11	2,78	8,33	0,00	2,78	0,00
ECFC 5	33,33	19,44	13,89	16,67	2,78	8,33	5,56
ECFC 6	50,00	0,00	0,00	13,89	36,11	2,78	0,00
ECFC 7	50,00	25,00	5,56	13,89	5,56	0,00	0,00
MW	53,72	11,95	4,81	12,30	11,11	4,96	1,54
STABW	13,90	8,35	4,44	4,28	12,08	5,76	2,09

CD44+ CD34+	keine Koloniebildung [%]	S [%]	M [%]	L [%]	XL [%]	XXL [%]	gr XXL [%]
ECFC 1	79,17	9,38	1,04	6,25	3,13	1,04	0,00
ECFC 2	66,67	0,00	4,17	3,13	13,54	8,33	4,17
ECFC 3	88,54	4,17	3,13	4,17	0,00	0,00	0,00
ECFC 4	94,79	2,08	2,08	1,04	0,00	0,00	0,00
ECFC 5	96,88	2,08	1,04	0,00	0,00	0,00	0,00
ECFC 6	97,22	0,00	2,78	0,00	0,00	0,00	0,00
ECFC 7	91,67	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MW	87,85	3,72	2,03	2,08	2,38	1,34	0,60
STABW	11,23	3,80	1,44	2,48	5,06	3,11	1,57

3.6.2 Bestimmung des Angiogenesepotentials von $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ ECFC Subpopulationen *in vitro*

Nachdem durch die Oberflächenmarker CD34 und CD44 Zellfraktionen mit unterschiedlichen Koloniebildungs- und Proliferationspotential beschrieben werden konnte, sollte untersucht werden, ob eine funktionelle Veränderung der $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen beobachtet werden kann. Die Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel gilt als *in vitro* Nachweis des Angiogenesepotentials endothelialer Zellen, weshalb mögliche Unterschiede des Angiogenesepotentials der 3 Zellfraktionen im Matrigel untersucht wurden.

Hierfür wurden jeweils 40.000 Zellen der Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ vergleichend auf vollwertigem sowie auf Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel ausplattiert und nach 15 h mikroskopisch dokumentiert. Es können die drei Parameter: tubulärartige Strukturen, Verzweigungspunkte und Ausbildung von Schlaufen unterschieden werden (Abb. 32). Diese Parameter wurden retrospektiv durch die Firma Wimasys (Wimasys GmbH, München, Deutschland) pro Bildausschnitt (1790,5 μm x 1341,6 μm) ermittelt, da keine entsprechende Auswertetechnik in unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stand.

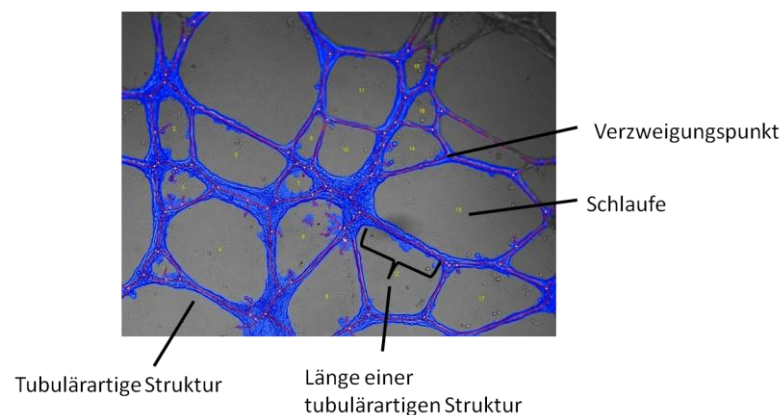


Abb. 32 : Erläuterung der Begriffe Verzweigungspunkt, Schlaufe und tubulärartige Struktur sowie der Länge einer tubulären Struktur anhand eines Beispiels.

Bildung tubulärartiger Strukturen im vollwertigen Matrigel. Die Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ bildeten tubulärartige Strukturen im Matrigel, wohingegen die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion keine vergleichbaren Strukturen ausbildeten (n=5) (Abb. 33).

In fünf unabhängigen Versuchen prägten im Durchschnitt bei den $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellen 105,8 ($\pm 17,4$) und bei den $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen 71,6 ($\pm 19,4$) tubulärartige Strukturen pro Bildausschnitt aus. Die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen zeigten hierbei die geringste Bildung tubulärartiger Strukturen pro Bildausschnitt (35,2 tubulärartige Strukturen $\pm 32,4$) (Tab. 13). Die meisten Verzweigungen pro Bildausschnitt bildeten mit 48,2 Verzweigungspunkten ($\pm 9,0$) die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion. Die $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen bildeten im Mittel 30,2 ($\pm 11,5$) und die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen 10,2 ($\pm 10,6$) Verzweigungspunkte pro Bildausschnitt (Tab. 13). Die höchste Anzahl von Schlaufen pro Bildausschnitt formten die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ (9,6 Schlaufen $\pm 4,3$), die zweithöchste Anzahl die $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellen (5,4 Schlaufen $\pm 3,1$) und die geringsten die Zellen der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion (3,2 Schlaufen $\pm 4,4$) (Tab. 13).

Tab. 13 : Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen pro Bildausschnitt.

MW= Mittelwert; STABW= Standardabweichung; p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt; n=5

tubulärartige Struktur	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺
ECFC 1	99	78	91
ECFC 2	107	38	11
ECFC 3	109	74	24
ECFC 4	83	81	34
ECFC 5	131	87	16
MW	105,8	71,6	35,2
STABW	17,41	19,37	32,38
T-test	p=	0,038	0,021 0,062
			++/- +/-

Verzweigungspunkte	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺
ECFC 1	51	35	27
ECFC 2	45	10	1
ECFC 3	56	39	8
ECFC 4	34	34	13
ECFC 5	55	33	2
MW	48,2	30,2	10,2
STABW	9,04	11,52	10,57
T-test	p=	0,033	0,004 0,017
			++/- +/-

Schlaufenbildung	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁺
ECFC 1	14	6	12
ECFC 2	4	1	0
ECFC 3	14	10	1
ECFC 4	5	7	1
ECFC 5	11	3	2
MW	9,6	5,4	3,2
STABW	4,83	3,51	4,97
T-test	p=	0,086	0,034 0,438
			++/- +/-

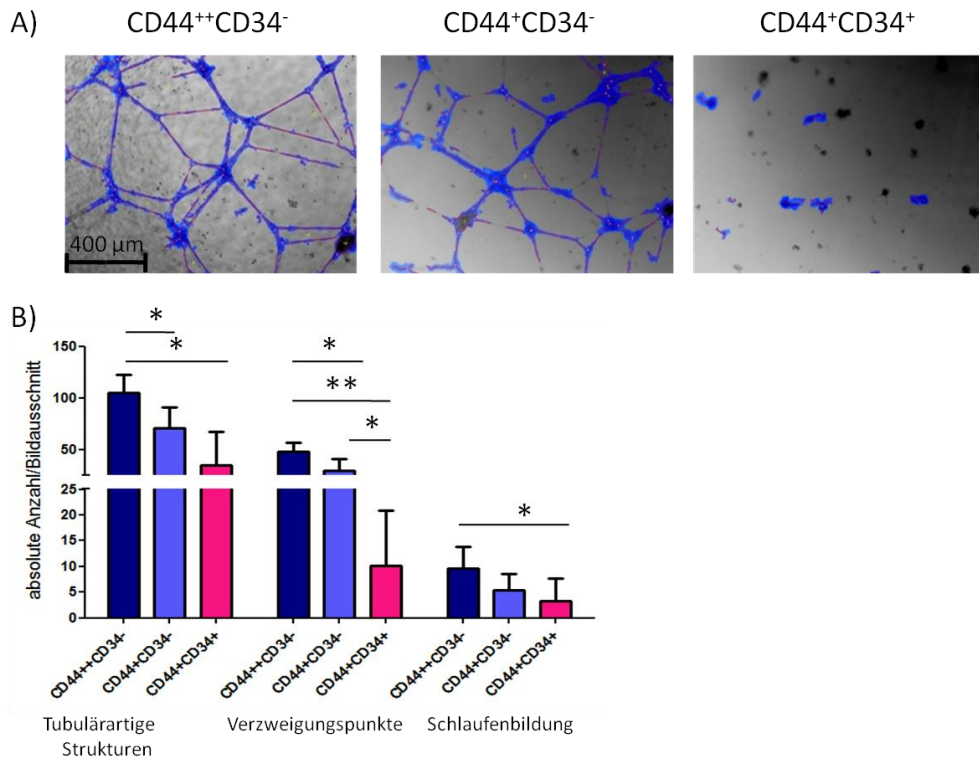


Abb. 33 : Bildung tubulärartiger Strukturen im vollwertigen-Matrigel.

(A) Repräsentative Aufnahmen der im Matrigel gebildeten tubulärartigen Strukturen jeder Zellfraktion pro Bildausschnitt ($1790,5 \mu\text{m} \times 1341,6 \mu\text{m}$) nach Auswertung der Firma Wimasys (50-fache Vergrößerung, Phasenkontrast); (B) Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkte und Schlaufen pro Bildausschnitt. Hierbei bildeten die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion im Mittel die höchste Anzahl an tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen im Vergleich zu den $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen aus ($n=5$); * = $p \leq 0,050$; ** = $p \leq 0,001$ (p -Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

Bildung tubulärartiger Strukturen im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel.

Nachdem die beiden primitiveren Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ sich aufgrund ihres Koloniebildungs-, Proliferations- und Angiogenesepotentials im vollwertigen Matrigel weniger stark zu der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion unterschieden, wurden mögliche Unterschiede des Angiogenesepotentials dieser Zellfraktionen im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel getestet.

Die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion und $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion konnten tubulärartige Strukturen im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel ausbilden ($n=3$) (Abb. 34). Eine erhöhte Anzahl an gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen bildeten die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion

aus (Tab. 14). Die jeweilige Länge der gebildeten tubulärartigen Strukturen unterschied sich im Mittel nur geringfügig voneinander (Tab. 14).

Tab. 14 : Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkte, Schlaufen sowie die Länge der gebildeten tubulärartigen Strukturen (μm) im Mittel im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel.

MW= Mittelwert; STABW= Standardabweichung; p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt; n=3

tubulärartige Struktur	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻
ECFC 1	104,00	31,00
ECFC 2	42,00	33,00
ECFC 3	82,00	73,00
MW	76,00	45,67
STABW	31,43	23,69
T-test	p=	0,291

Schlaufenbildung	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻
ECFC 1	13,00	1,00
ECFC 2	3,00	3,00
ECFC 3	2,00	0,00
MW	6,00	1,33
STABW	6,08	1,53
T-test	p=	0,336

Verzweigungspunkte	CD44 ⁺⁺ CD34 ⁻	CD44 ⁺ CD34 ⁻
ECFC 1	55,00	12,00
ECFC 2	30,00	20,00
ECFC 3	20,00	16,00
MW	35,00	16,00
STABW	18,03	4,00
T-test	p=	0,258

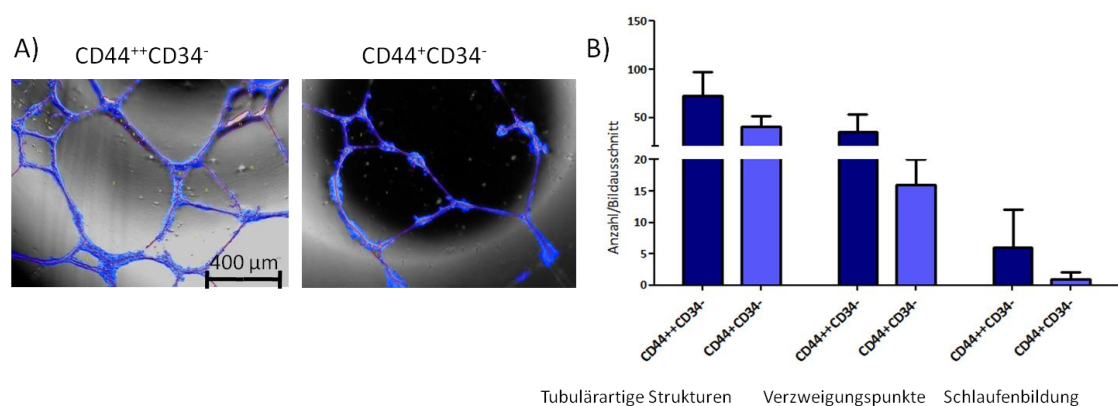


Abb. 34 : Bildung tubulärartiger Strukturen der CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion und CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion im Wachstumsfaktor-reduzierten Matrigel.

(A) Repräsentative Abbildung gebildeter tubulärartiger Strukturen von CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion und der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion pro Bildausschnitt (1790,5 μm x 1341,6 μm) nach Auswertung der Firma Wimasis (Phasenkontrast); (B) Anzahl der gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen pro Bildausschnitt. Die höchste Anzahl an gebildeten tubulärartigen Strukturen, Verzweigungspunkten und Schlaufen wurde in der CD44⁺⁺CD34⁻ Zellfraktion gemessen (n=3). * = $p \leq 0,050$; ** = $p \leq 0,001$ (p-Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

3.6.3 Migrationspotential

Im weiteren Verlauf wurde das Migrationspotential der $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktionen auf weitere funktionelle Unterschiede untersucht. Hierfür wurde in den von $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ ECFCs gebildeten Monolayer ein Spalt gezogen und die Besiedlung des freien Raums durch die Zellen über Zeitrafferaufnahmen dokumentiert.

Die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion migrierten im Mittel langsamer als die Zellen der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion ($p=0,038$, $n=4$) (Abb. 35). Die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion betrug im Mittel $0,49 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\pm 0,16$) sowie die der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion $0,66 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\pm 0,19$).

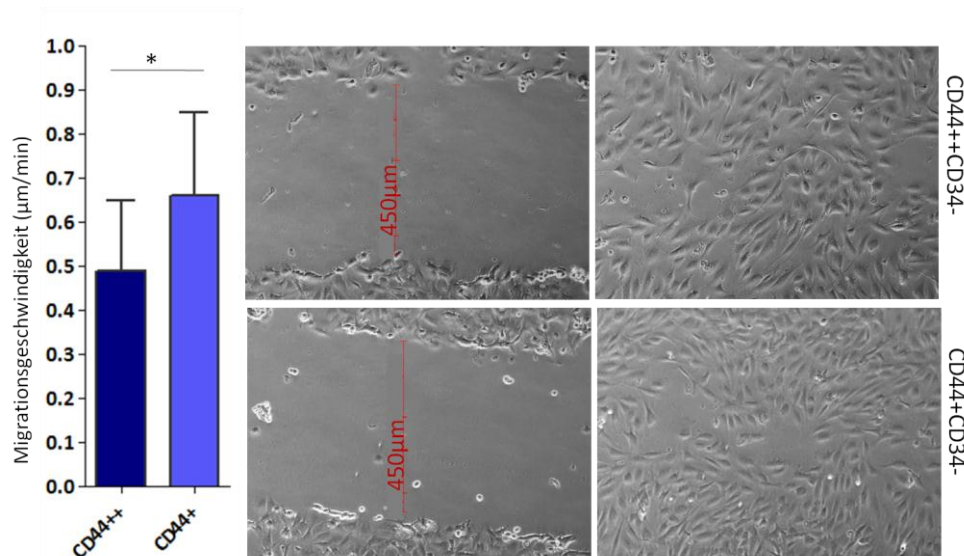


Abb. 35 : Migrationsgeschwindigkeit der Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion im Vergleich zu den Zellen der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion.

In drei unabhängigen Versuchen wiesen die $CD44^{++}$ Zellen mit $0,49 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\pm 0,16$) im Mittel eine geringere Migrationsgeschwindigkeit als die $CD44^{+}$ Zellen auf ($0,66 \mu\text{m}/\text{min}$; $\pm 0,19$; $p=0,03$; $n=3$).

* = $p \leq 0,050$ (p -Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

3.6.4 Kryoschnitte humaner Nabelschnurvenen für *in situ* Analysen

Um die Expression von CD34 und CD44 *in situ* zu untersuchen, wurden frisch isolierte Nabelschnüre in Kollaboration kryokonserviert und die Expression der Endothelmarker CD31 sowie der Oberflächenproteine CD34 und CD44 untersucht. Hierbei wurden Ausschnitte der Vene näher betrachtet, um die Expression von CD34 und CD44 an HUVECs zu beurteilen (Abb. 36). Eine spezifische Färbung von CD31 für Endothelzellen

im äußeren Rand der Intima, die einen Monolayer als Abgrenzung zwischen Vene und Lumen bildeten, konnte nachgewiesen werden (Abb. 36-A). Ebenfalls wurden vereinzelte CD31 positive Zellen in der Gefäßwand bzw. dem mesenchymalen Bindegewebe lokalisiert. Die Expression von CD34 beschränkte sich auf den Monolayer aus reifen, funktionsfähigen HUVECs und wurde nicht in Arealen des interzellularen Gewebes nachgewiesen (Abb. 36-B). Die Färbung des Antigens CD44 markierte wenige Zellen des Monolayer aus HUVECs und vereinzelte Zellen im mesenchymalen Bindegewebe (Abb. 36-C). Die Zellen des Nabelschnurrandes wiesen hingegen eine starke Färbung für CD44 auf (Abb. 36-D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die differenzierten funktionellen Endothelzellen der Nabelschnurvene eine starke Expression für CD34 aufweisen und nur vereinzelte Zellen CD44 exprimieren. Diese Beobachtung unterstützt unsere Hypothese, dass CD34 einen Marker für differenzierte endotheliale Vorläuferzellen darstellt sowie CD44 auf reifen Zellen runterreguliert wird.

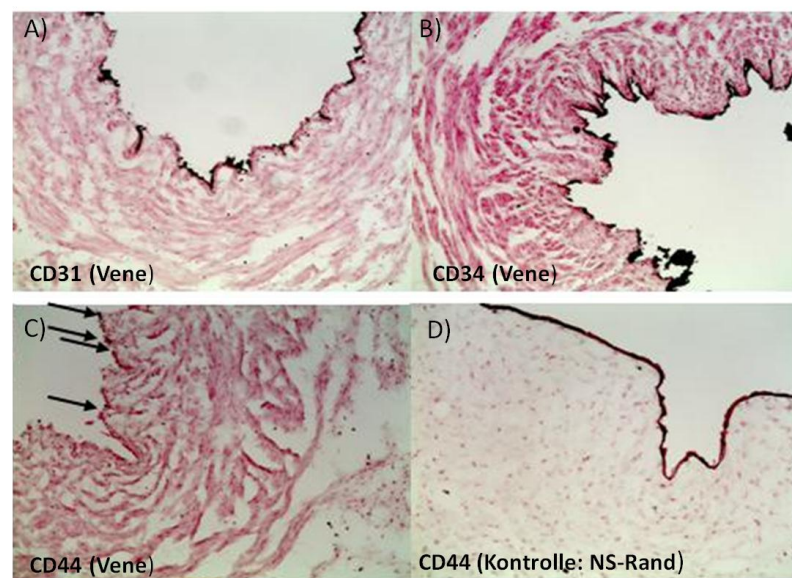


Abb. 36 : In situ Expression von CD34 und CD44 auf HUVECs.

Alle HUVECs exprimieren den endotheltypischen Marker CD31 **(A)**. Einhergehend mit der Hypothese, dass CD34 auf reiferen Vorläuferzellen hochreguliert wird, exprimieren alle differenzierten, funktionellen HUVECs CD34 **(B)**, wenige HUVECs exprimieren CD44 **(C)**. Eine starke Expression für CD44 konnte in den Zellen des Nabelschnurrandes nachgewiesen werden **(D)**. Kryoschnitte einer humanen Nabelschnurvene, 100-fache Vergrößerung, Phasenkontrast; rosa: Kernfärbung mittels Hämatoxylin/Eosin (HE), schwarz-braun: Zweitfärbung mittels HRP (Peroxidase)-markiertem Sekundäntikörper und Entwicklung mit DAB (diaminobenzidine); NS=Nabelschnur

3.7 Genetische Manipulation endothelialer Vorläuferzellen

Wie unter Punkt 1.4 beschrieben ist der Notch-Signalweg in vielen Stammzellsystemen an der Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Komponenten dieses Signalwegs einen Einfluss auf das Zellschicksal endothelialer Vorläuferzellen ausüben. Zu diesem Zweck wurden HUVECs genetisch manipuliert. Dabei wurde ein lentivirales System verwendet, um entsprechende Mediatoren des Notch-Signalwegs ektopisch zu exprimieren. Es wurden Untersuchungen zum Funktionszugewinn und Funktionsverlust durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die intrazelluläre Domäne von Notch1 (NICD1) in den Zellen exprimiert als auch Hey1, Hey2, Hes1 sowie die vier Varianten von Numb (Nb1-4) und sein Homolog Numbl like (NbL) in den Zellen überexprimiert und Nb und NbL in den Zellen herunterreguliert. Zur direkten Inhibition des Notch-Signalwegs wurde dominant negatives Mastermind-like1 (dnMAML1) verwendet.

Um Mutagenesen und multiple Insertionen zu verhindern, wurde in Vorversuchen standardmäßig der Virustiter des jeweilig produzierten virushaltigen Überstandes so eingestellt, dass eine 30-50 %ige Transduktionseffizienz erzielt wurde (Daten nicht abgebildet).

Durch die Messung der Expression des eGFP-Reporterproteins in den Zellen wurde die Transduktionseffizienz innerhalb der transduzierten Zellpopulation quantifiziert (Abb. 37, Tab. 15).

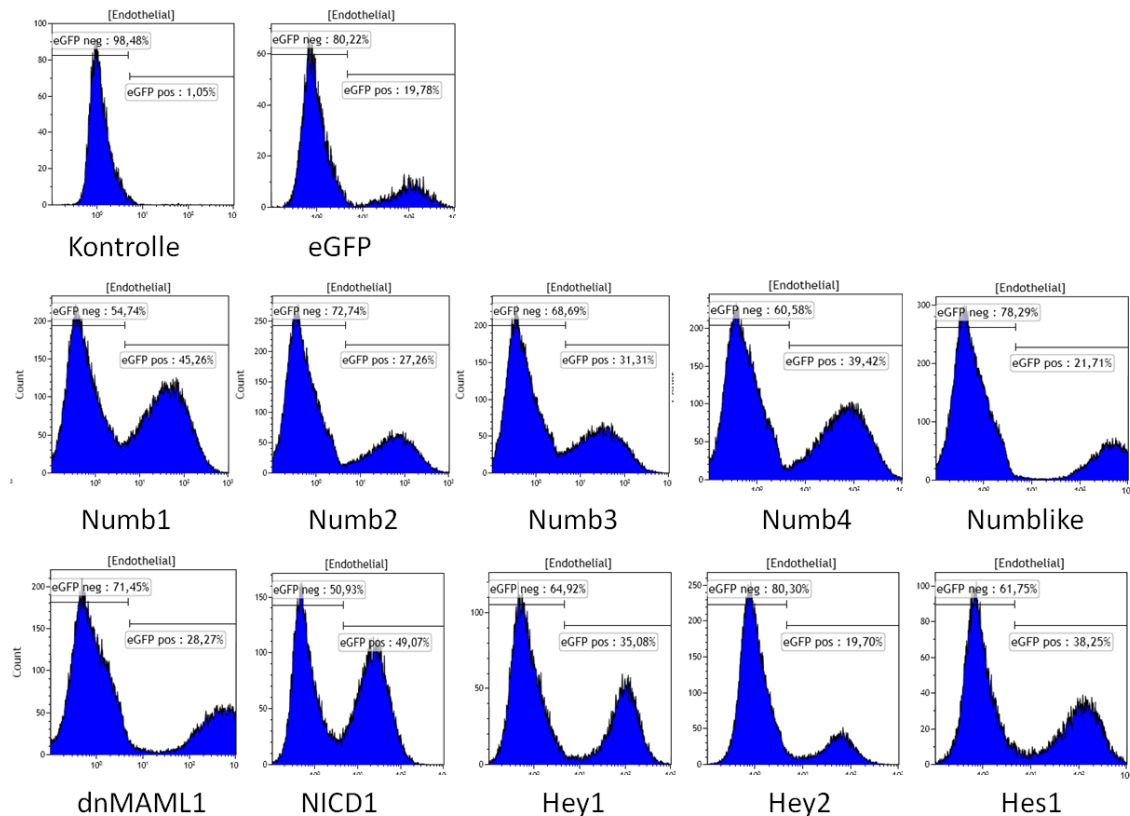


Abb. 37 : Durchflusszytometrische Quantifizierung der Transduktionseffizienz.

Durchflusszytometrische Messung des eGFP-Fluoreszenzsignals genetisch manipulierter HUVECs an Tag 3 nach Transduktion; Darstellung von repräsentativen Ergebnissen von 1 von 5 unabhängigen Versuchen.

Tab. 15 : Transduktionseffizienzen.

Die Transduktionseffizienzen lentiviral transduzierter HUVECs wurden an Tag 3 nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt (n=5). MW=Mittelwert; STABW=Standardabweichung.

HUVEC	eGFP [%]	Numb1 [%]	Numb2 [%]	Numb3 [%]	Numb4 [%]	NumbLike [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]
1	45,06	50,72	68,56	34,48	52,73	60,43	49,11	40,08	62,73	15,57	56,73
2	19,78	45,26	27,26	31,31	39,42	21,71	28,27	49,07	35,08	19,07	38,25
3	19,79	43,86	62,65	24,66	36,53	44,43	49,63	22,41	19,51	5,24	22,23
4	47,4	56,72	63,93	44,2	36,82	40,95	42,99	19,26	6,28	4,96	64,61
5	35,74	38,21	54,66	45,77	56,9	57,23	59,23	40,14	40,23	15,44	22,65
MW	33,55	46,95	55,41	36,08	44,48	44,95	45,85	34,19	32,77	12,06	40,89
STABW	13,30	7,04	16,51	8,88	9,62	15,39	11,41	12,78	21,43	6,52	19,37

3.7.1 Einfluss von Nb1-4, NbL, dnMAML1, NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 auf das Proliferationsverhalten genetisch manipulierter HUVECs

Da bekannt ist, dass der Notch-Signalweg einen Einfluss auf die Proliferation und Reifung somatischer Stammzellen haben kann (Bigas and Espinosa, 2012), wurde der Einfluss der Überexpression der einzelnen Faktoren auf das Proliferationsverhalten von

HUVECs untersucht. Hierfür wurde die Anzahl der Zellteilungen der genetisch manipulierten Zellen bestimmt.

Es wurden jeweils 5.000 eGFP positive (eGFP⁺) Zellen in Passage zwei nach Transduktion durchflusszytometrisch separiert und in ein 9,6 cm² großes Zellkulturgefäß ausgesät. Die diesen Versuchen zugrunde liegende Strategie zur durchflusszytometrischen Zellseparation ist in Abb. 38 dargestellt. Nach Festlegung der HUVEC-Population (Abb. 38-A) wurde der Anteil an eGFP⁺-Zellen ermittelt (Abb. 38-B). Nach Sortierung der eGFP⁺-Zellen, wurde deren Reinheit durch eine erneute durchflusszytometrische Messung bestimmt (Abb. 38-C).

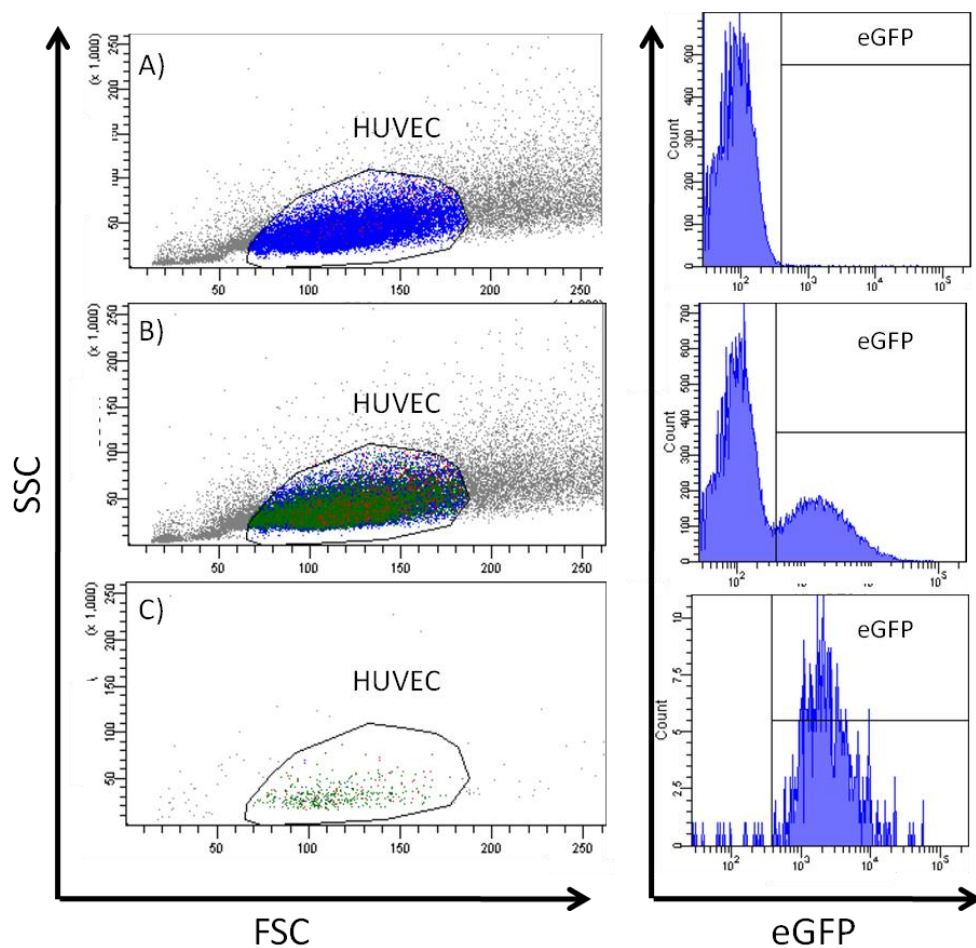


Abb. 38: Strategie zur durchflusszytometrischen Zellseparation von eGFP-exprimierenden HUVECs.

Durch die Definition der Gates „HUVEC“ und „GFP“ wurde vorgegeben, welche Zellen durchflusszytometrisch sortiert werden sollten. **(A)** Nicht transduzierte Kontrollzellen; **(B)** HUVEC-Linie bestehend aus genetisch manipulierten (eGFP⁺) und nicht manipulierten (eGFP⁻) HUVECs vor durchflusszytometrischer Separation. **(C)** Ermittlung der Reinheit der sortierten Zellen durch erneute Messung der unter **(B)** dargestellten Population nach durchflusszytometrischer Sortierung auf Zellen, die das Reporterprotein eGFP exprimieren.

Die unbehandelten Kontrollzellen teilten sich im Mittel 43-mal (± 15 ; $n=5$) und die eGFP-Kontrollen im Mittel 42-mal (± 12 , $n=5$). Durch die Expression von eGFP wurde das Proliferationsverhalten der Zellen nicht verändert. Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen teilten sich im Durchschnitt 25-30 Teilungen weniger als die Kontrollzellen (Abb. 40, Tab. 16). Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen ausübt. Eine direkte Inhibierung des Notch-Signalwegs wurde durch die Expression von dnMAML1 herbeigeführt. Im Mittel teilten sich die dnMAML1 exprimierenden Zellen 45-mal (± 14 , $n=5$). Im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte sich nach Inhibierung des Notch-Signalwegs die Proliferation der Zellen um 2-3 Teilungen. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob Numb als möglicher Modulator des Notch-Signalwegs (McGill et al., 2009; McGill and McGlade, 2003) und Numblike einen ähnlichen Effekt auf das Proliferationsverhalten ausüben. Hierbei wiesen in fünf unabhängigen Versuchen alle Numb (Nb1-4) und Numblike überexprimierenden HUVECs im Mittel eine Erhöhung der Proliferation um 3-5 Teilungen im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Abb. 40, Tab. 16).

Tab. 16 : Anzahl der durchschnittlichen Teilungen nach Überexpression potentieller Mediatoren des Notch-Signalwegs.

Darstellung der Werte aus 5 unabhängigen Versuchen sowie deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW). Alle p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

	Kon	eGFP	Nb1	Nb2	Nb3	Nb4	NbL	dnMAML1	NICD1	Hey1	Hey2	Hes1
HUVEC 1	68,12	62,95	73,42	76,40	69,32	66,76	73,71	69,88	16,64	21,21	19,85	18,70
HUVEC 2	39,03	41,47	44,87	44,58	43,00	45,20	45,87	39,02	4,32	13,81	4,32	4,32
HUVEC 3	42,00	40,29	44,25	43,19	49,75	44,23	43,03	44,00	28,80	29,59	18,01	19,46
HUVEC 4	35,01	35,81	38,61	37,45	38,94	38,64	38,49	34,13	18,68	16,94	16,59	20,16
HUVEC 5	30,89	30,86	36,34	40,32	36,02	38,77	39,59	39,68	25,25	11,30	13,38	4,49
MW	43,01	42,28	47,50	48,39	47,41	46,72	48,14	45,34	18,74	18,57	14,43	13,43
STABW	14,65	12,29	14,94	15,90	13,29	11,60	14,59	14,16	9,43	7,19	6,13	8,25
T-Test	p=	0,601	0,003 0,020	0,028 0,055 0,456	0,014 0,020 0,957 0,699	0,082 0,007 0,640 0,462 0,678	0,018 0,024 0,439 0,744 0,737 0,377	0,243 0,245 0,263 0,095 0,314 0,470 0,127	0,043 0,039 0,029 0,029 0,019 0,019 0,026 0,026	0,015 0,011 0,011 0,013 0,005 0,006 0,011 0,005 0,968	0,008 0,006 0,006 0,006 0,003 0,003 0,005 0,005 0,223 0,199	0,007 0,005 0,006 0,008 0,003 0,003 0,006 0,007 0,292 0,107 0,661

Eine Überexpression von Nb und NbL bewirkte im Mittel eine erhöhte Anzahl an Zellverdoppelungen. Als nächstes stellte sich die Frage, ob eine Herunterregulation von Nb und NbL zu einer erniedrigten Zellteilung führt. Zu diesem Zweck wurden Nb und NbL durch die Expression von kurzen Haarnadel-RNAs (*short hairpin RNAs/shRNA*) durch einen lentiviralen Doxzyklin-induzierbaren Vektor herunterreguliert. In dem Vektor *pTRIPZ-shRNAmir-Numb* befindet sich zusätzlich die kodierende Region von tRFP und in dem Vektor *pEGIPZ-shRNAmir-Numblike* die für eGFP. Im Folgenden werden HUVECs, die mit den lentiviralen Vektoren transduziert worden sind, die die Nb-shRNA Kasette enthalten, als HUVEC^{Nb-KD}, die die NbL-shRNA Kasette enthalten als HUVEC^{NbL-KD} sowie doppelt transduzierte Zellen als HUVEC^{Nb+NbL-KD} bezeichnet (KD=*knock down*).

Die Herunterregulation der Expression von Nb und NbL kodierender RNA durch die Vektoren *pTRIPZ-shRNAmir-Numb* und *pEGIPZ-shRNAmir-Numblike* wurde an Zellen, die mit *pTRIPZ-shRNAmir-Numb* und *pEGIPZ-shRNAmir-Numblike* einzeln bzw. kotransduziert wurden, auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen (Abb. 39-A). Die Herunterregulation von Nb und NbL durch diese Vektoren auf Proteinebene wurde bereits zuvor in der Arbeitsgruppe an HEK-293T Zellen qualifiziert (Daten nicht gezeigt), jedoch aufgrund der geringen Transduktionseffizienz und der daraus resultierenden geringen Zellmenge nicht an HUVECs wiederholt (Tab. 17). Bezüglich des geringen Anteils an HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} nach Transduktion (Abb. 39-B) wurden für alle folgenden Versuche die eGFP⁺ bzw. tRFP⁺ Zellen durchflusszytometrisch aufgereinigt, expandiert und erneut durchflusszytometrisch aufgereinigt, bis eine adäquate Menge an Zellen vorhanden waren (Abb. 39-C).

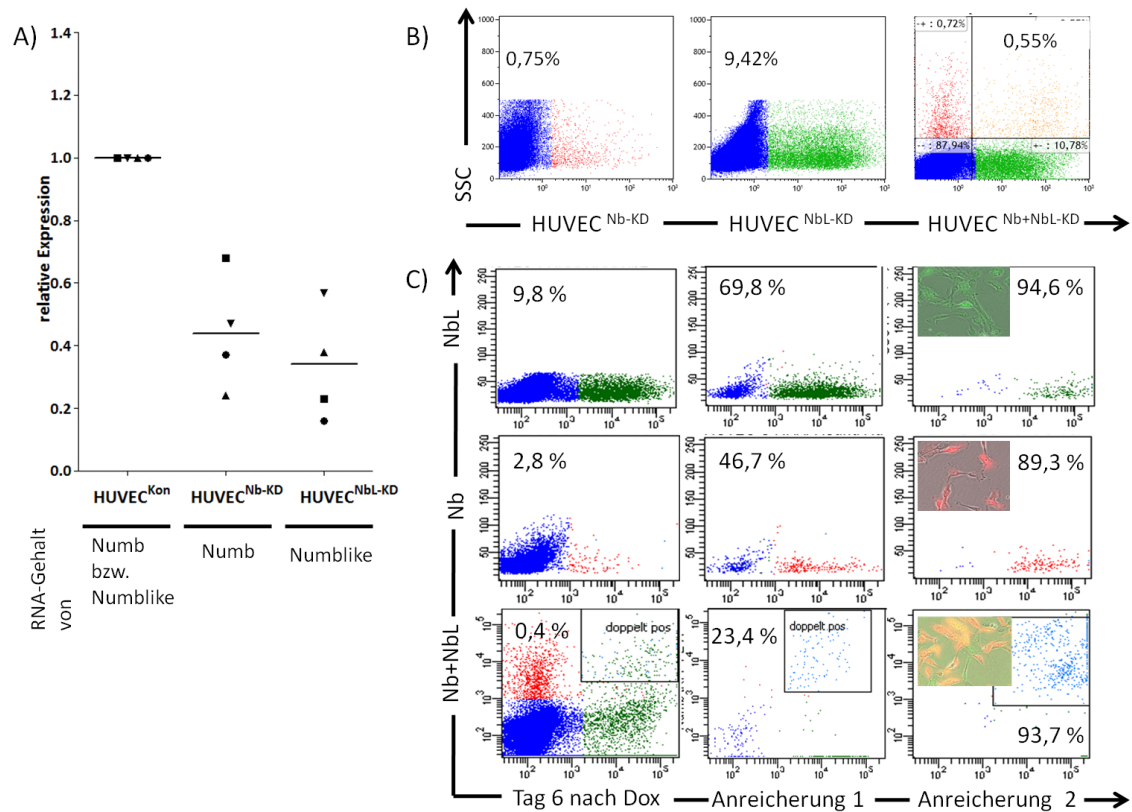


Abb. 39: Herunterregulation der Expression von Nb und Nbl

(A) Nachweis der Herunterregulation der Expression von Nb und Nbl kodierender RNA mittels qRT-PCR ($n=4$). **(B)** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils an HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{Nbl-KD} und HUVEC^{Nb+Nbl-KD} Zellen an Tag 3 nach Induktion durch Doxyzyklin. **(C)** Durchflusszytometrische Anreicherung der HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{Nbl-KD} und HUVEC^{Nb+Nbl-KD} Zellen über die Expression des Reporterproteins tRFP bzw. eGFP; mikroskopische Betrachtung der aufgereinigten Zellen (Foto).

Tab. 17: Transduktionseffizienzen.

Die Transduktionseffizienzen lentiviral transduzierter HUVECs mit den Vektoren pTRIPZ-shRNAmir-Numb und pEGIPZ-shRNAmir-Numblike wurden an Tag 3 nach Induktion durch Doxyzyklin durchflusszytometrisch bestimmt ($n=4$). MW=Mittelwert, STABW=Standardabweichung

HUVEC	shRNA [%]	shRNA-Nb [%]	shRNA-Nbl [%]	shRNA-Nb+Nbl [%]
1	3,20	0,75	9,40	0,56
2	5,10	2,80	9,80	0,40
3	13,50	10,30	18,50	1,10
4	10,30	9,80	18,80	4,00
MW	8,03	5,91	14,13	1,52
STABW	4,73	4,85	5,23	1,68

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der genetisch manipulierten Zellen, wurden jeweils 5.000 HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{Nbl-KD} und HUVEC^{Nb+Nbl-KD} Zellen durchflusszytometrisch separiert und in ein 9,6 cm² großes Zellkulturgefäß ausgesät.

Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurde die Zellzahl bestimmt und erneut 5.000 Zellen ausgesät. Dieser Prozess wurde wiederholt, bis die Zellen einen post-mitotischen Zustand erreichten.

Die unbehandelten Kontrollzellen teilten sich im Mittel 46-mal (± 15 ; $n=4$) sowie die mit dem Leervektor transduzierten Zellen sich im Mittel 45-mal (± 12 ; $n=4$) teilten. Durch die Expression von tRFP wurde das Proliferationsverhalten der Zellen nicht verändert. Nach Herunterregulation der Expression für Nb oder NbL teilten sich die Zellen im Mittel knapp 19 Teilungen weniger als die Kontrollzellen (Tab. 18, Abb. 40). Nach Herunterregulation der Expression für Nb und NbL teilten sich die Zellen knapp 33-mal weniger (Tab. 18, Abb. 40).

Zusammenfassend teilten sich die Zellen nach Überexpression von Nb und NbL häufiger und nach Herunterregulation der Expression für Nb und NbL weniger im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die geringste Anzahl an Zellteilungen konnte bei den HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass bei einer Herunterregulation der Expression von nur einem der Komponenten ein Ausgleich durch den anderen stattfindet.

Tab. 18: Anzahl der durchschnittlichen Teilungen nach Herunterregulation von Nb und NbL.

Darstellung der Werte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW). Kon=unbehandelte Kontrolle, shRNA=Leervektor; Alle p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

	Kon	shRNA	shRNA-Nb	shRNA-NbL	shRNA-Nb+NbL	
HUVEC 1	68,12	62,95	27,71	30,47	10,16	
HUVEC 2	39,03	41,47	34,18	31,73	14,93	
HUVEC 3	42,00	40,29	35,11	37,81	15,55	
HUVEC 4	35,01	35,81	11,71	14,30	12,71	
MW	46,04	45,13	27,18	28,58	13,34	
STABW	15,00	12,13	10,82	10,04	2,44	
T-Test	p=	0,621	0,107	0,106	0,031	Kon
			0,087	0,087	0,020	shRNA
				0,355	0,069	shRNA-Nb
					0,047	shRNA-NbL

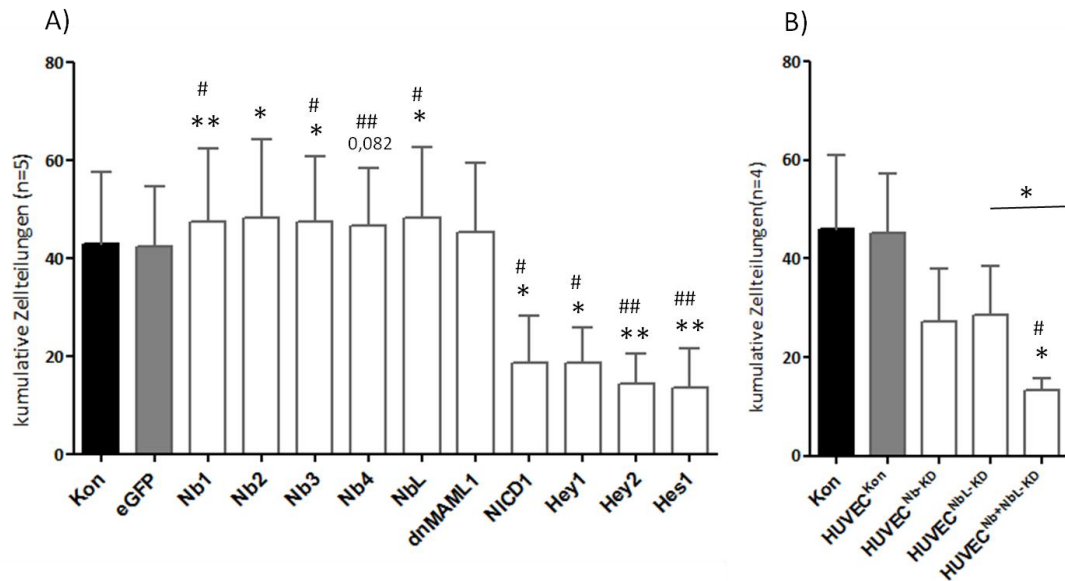


Abb. 40: Anzahl der durchschnittlichen Teilungen genetisch manipulierter HUVECs.

(A) Im Mittel teilten sich Numb (Nb1-4) und Numbl (NbL) überexprimierende Zellen 3-5-mal mehr als die Kontrollzellen (n=5). Die NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen teilten sich im Mittel 25-30-mal weniger als die Kontrollzellen (n=5). **(B)** Nach Herunterregulation der Expression für Numb (Nb-KD) oder Numbl (NbL-KD) proliferierten die Zellen im Mittel 19 Teilungen weniger im Vergleich zur Kontrolle (n=4). Nach Herunterregulation der Expression für Numb und Numbl (Nb+NbL-KD) teilten sich die Zellen 33 Teilungen weniger als die Kontrollzellen; $p \leq 0,05$ wurden mit * bzw. #, $p \leq 0,005$ mit ** bzw. ## markiert; * = gegen die unbehandelte Kontrolle, # = gegen die Leervektorkontrolle; Alle p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt; Kon: unbehandelte Kontrolle, eGFP: eGFP-Leervektor, Nb: Numb, NbL: Numbl, dnMAML1: dominant negatives Mastermind-like1, NICD1: Notch1^{icd}; HUVECKon: shRNA Leervektor, HUVEC^{Nb-KD}: Zellen transduziert mit dem Vektor pTRIPZ-shRNAmir-Numb, HUVEC^{NbL-KD}: Zellen transduziert mit dem Vektor pEGIPZ-shRNAmir-Numbl, sowie doppelt transduzierte Zellen: HUVEC^{Nb+NbL-KD}.

3.7.1.1 Untersuchung des Effekts der genetischen Veränderung auf die Wachstumskinetik

Da die genetische Manipulation der Zellen zu einer erhöhten bzw. erniedrigten Anzahl an Zellteilungen führte (3.7.1), stellte sich die Frage, ob die genetische Manipulation der Zellen ein Effekt auf die Wachstumskinetik ausübt.

Zur Quantifizierung potentieller Wachstumsvor- bzw. nachteile genetisch manipulierter Zellen gegenüber den Kontrollzellen, wurde ihr Anteil innerhalb einer Mischpopulation aus transduzierten (eGFP⁺) und nicht transduzierten (eGFP⁻) Zellen dokumentiert. Hierfür wurde die Expression des Reporterproteins über den Zeitraum von 8 bzw. 4 Passagen durchflusszytometrisch gemessen.

Der Anteil an eGFP⁺ oder tRFP⁺ Zellen über die Zeit blieb bei den Leervektorkontrollen ähnlich (Abb. 41); das Reporterprotein übte keinen selektiven Einfluss auf die Zellen aus. Der Anteil an eGFP⁺ Zellen stieg im Mittel bei allen Nb1-4 und NbL überexprimierenden Zellen im Verlauf der Zeit an (Tab. 19-A, Abb. 41-A). Ein um knapp 50 % verringerter Anteil an HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{NbL-KD} Zellen und ein 75 % Rückgang an HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen wurde 2 Passagen nach Versuchsbeginn detektiert (Tab. 19-B, Abb. 41-B). Mit jeder Passage verringerte sich stetig der Anteil an NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 positiven Zellen (Tab. 19-A, Abb. 41-C). Nach 4-6 Passagen nach Versuchsbeginn befanden sich nur noch wenige eGFP⁺ Zellen innerhalb der NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 HUVEC-Linie. Der Anteil an eGFP⁺ Zellen über die Zeit blieb bei den dnMAML1 exprimierenden Zellen konstant (Tab. 19-A+B, Abb. 41-C).

Tab. 19 : Anteil genetisch manipulierter Zellen in einem Zeitraum von 4 bzw. 8 Passagen.

(A) Darstellung des Anteils an eGFP+ Zellen (%) der eGFP, Nb1-4, NbL, dnMAML1, NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 transduzierten HUVECs in p4 (n=5), p6 (n=4) und p8 (n=4) nach Transduktion. **(B)** Darstellung des Anteils an eGFP⁺ bzw. tRFP⁺ Zellen (%) der Leervektorkontrolle (HUVEC^{Kon}), HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen in p2, p3 und p4 (n=4) nach Induktion mit Doxzyklin. Der Versuchsbeginn in p2 erfolgte nach durchflusszytometrischer Anreicherung der eGFP⁺ bzw. tRFP⁺ Zellen, um einen adäquaten Anteil transduzierter Zellen analysieren zu können; Auflistung aller durchflusszytometrisch ermittelten Werte [%], deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW).

A)

GFP Start p2

HUVEC	eGFP [%]	Nb1 [%]	Nb2 [%]	Nb3 [%]	Nb4 [%]	NbL [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]
1	40,00	64,00	77,00	44,00	76,00	93,00	88,00	20,00	66,00	24,00	64,00
2	50,00	58,00	60,00	24,00	48,00	77,00	53,00	67,00	53,00	50,00	17,00
3	16,00	44,00	25,00	30,00	45,00	25,00	24,00	43,00	55,00	15,00	60,00
4	57,00	74,00	67,00	42,00	74,00	47,00	35,00	75,00	64,00	45,00	52,00
5	5,00	34,00	55,00	16,00	28,00	43,00	45,00	26,00	32,00	10,00	26,00
MW	33,60	54,80	56,80	31,20	54,20	57,00	49,00	46,20	54,00	28,80	43,80
STABW	22,28	15,91	19,60	11,88	20,47	27,46	24,36	24,32	13,51	17,88	21,05

GFP p4PT

HUVEC	eGFP [%]	Nb1 [%]	Nb2 [%]	Nb3 [%]	Nb4 [%]	NbL [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]
1	44,00	78,00	88,00	63,00	91,00	99,00	93,00	10,00	33,00	10,00	7,00
2	47,00	63,00	62,00	23,00	46,00	80,00	48,00	35,00	12,00	26,00	5,00
3	15,00	47,00	23,00	31,00	49,00	24,00	21,00	17,00	15,00	7,00	1,00
4	51,00	60,00	68,00	31,00	80,00	65,00	21,00	54,00	32,00	21,00	13,00
5	5,00	47,00	68,00	24,00	57,00	82,00	47,00	24,00	15,00	4,00	2,00
MW	32,40	59,00	61,80	34,40	64,60	70,00	46,00	28,00	21,40	13,60	5,60
STABW	20,90	12,90	23,82	16,43	19,88	28,40	29,43	17,22	10,21	9,45	4,77

GFP p6PT

HUVEC	eGFP [%]	Nb1 [%]	Nb2 [%]	Nb3 [%]	Nb4 [%]	NbL [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]
1	38,00	67,00	85,00	55,00	90,00	99,00	79,00	3,00	18,00	8,00	6,00
2	48,00	68,00	64,00	21,00	51,00	79,00	48,00	5,00	0,00	0,00	2,00
3	17,00	44,00	23,00	30,00	52,00	21,00	18,00	5,00	7,00	2,00	1,00
4								2,00	2,00	0,60	1,00
5	3,00	51,00	73,00	44,00	66,00	98,00	43,00	17,00	4,00	0,00	0,00
MW	26,50	57,50	61,25	37,50	64,75	74,25	47,00	6,40	6,20	2,12	2,00
STABW	20,31	11,90	26,91	15,02	18,17	36,67	25,05	6,07	7,09	3,39	2,35

GFP p8PT

HUVEC	eGFP [%]	Nb1 [%]	Nb2 [%]	Nb3 [%]	Nb4 [%]	NbL [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]
1	35,00	78,00	90,00	62,00	97,00	100,00	92,00	0,00	5,00	0,70	4,00
2	48,00	68,00	64,00	21,00	51,00	79,00	48,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	13,00	46,00	57,00	41,00	59,00	36,00	19,00	2,00	1,00	1,00	0,00
4								0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,00	49,00	86,00	36,00	75,00	96,00	40,00	11,00	0,00	0,00	0,00
MW	25,00	60,25	74,25	40,00	70,50	77,75	49,75	2,60	1,20	0,34	0,80
STABW	20,12	15,33	16,21	16,95	20,29	29,28	30,71	4,77	2,17	0,48	1,79

B)

Start p2

HUVEC	HUVEC ^{Kon} [%]	HUVEC ^{Nb-KD} [%]	HUVEC ^{NbL-KD} [%]	HUVEC ^{Nb+NbL-KD} [%]
1	40,00	30,00	48,00	12,00
2	50,00	85,00	76,00	30,00
3	16,00	85,00	86,00	35,00
MW	35,33	66,67	70,00	25,67
STABW	17,47	31,75	19,70	12,10

p3

HUVEC	HUVEC ^{Kon} [%]	HUVEC ^{Nb-KD} [%]	HUVEC ^{NbL-KD} [%]	HUVEC ^{Nb+NbL-KD} [%]
1	44,00	20,00	25,00	6,00
2	47,00	93,00	59,00	11,00
3	15,00	71,00	85,00	20,00
MW	35,33	61,33	56,33	12,33
STABW	17,67	37,45	30,09	7,09

p4

HUVEC	HUVEC ^{Kon} [%]	HUVEC ^{Nb-KD} [%]	HUVEC ^{NbL-KD} [%]	HUVEC ^{Nb+NbL-KD} [%]
1	38,00	15,00	19,00	4,00
2	48,00	77,00	13,00	11,00
3	17,00	85,00	85,00	9,00
MW	34,33	59,00	39,00	8,00
STABW	15,82	38,31	39,95	3,61

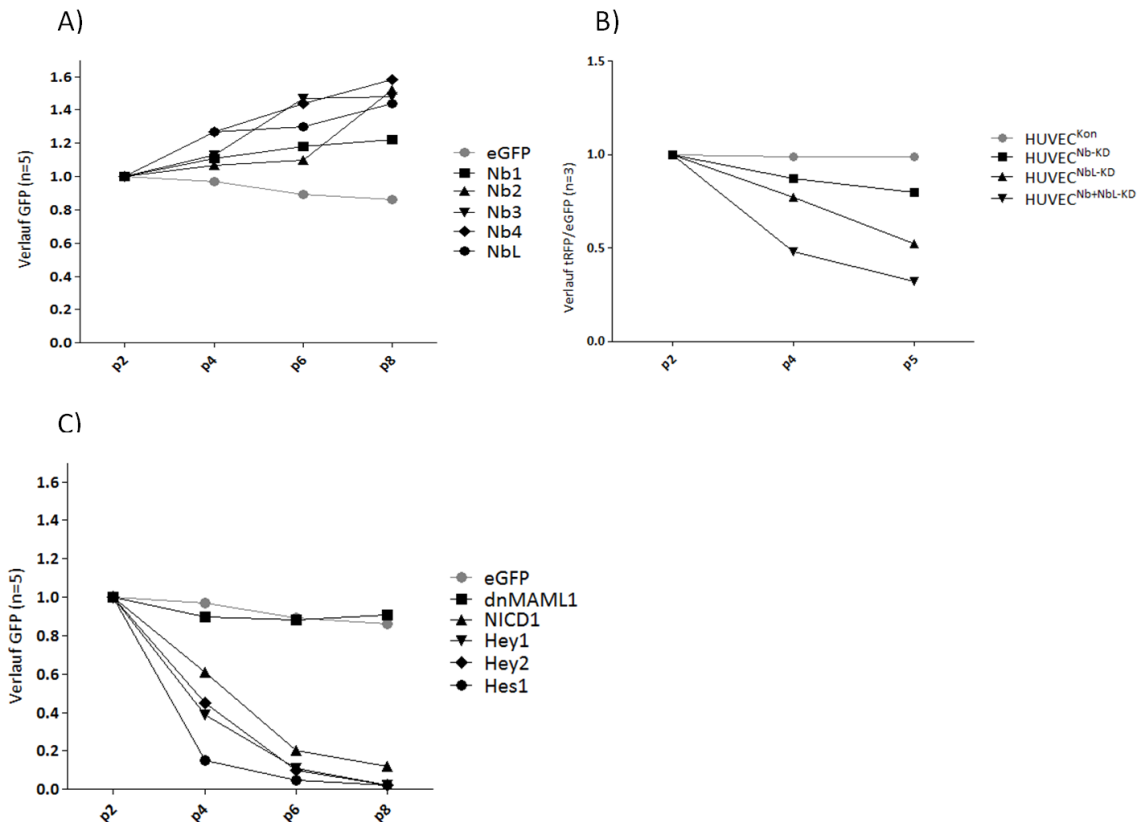


Abb. 41: Wachstumskinetik genetisch manipulierter HUVECs.

Der Anteil $eGFP^+$ bzw. $tRFP^+$ Zellen wurde über die Zeit quantifiziert. Ein Anstieg $eGFP^+$ Zellen über die Zeit bedeutet einen selektiven Wachstumsvorteil, wie es bei den Numb1-4 und NbL überexprimierenden HUVECs auftrat (**A**). Ein verringerter Anteil an $eGFP^+$ bzw. $tRFP^+$ Zellen deutet auf einen selektiven Wachstumsnachteil hin. Bei den Analysen wurde bei den $HUVEC^{Nb-KD}$, $HUVEC^{NbL-KD}$ und $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen (**B**) und den NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen (**C**) ein selektiver Wachstumsnachteil festgestellt. Der Anteil der Leervektorkontrollzellen und dnMAML1 exprimierenden Zellen blieb über die Zeit ähnlich, was auf keinen selektiven Einfluss hindeutet (**C**). Die Ausgangswerte der eGFP Expression aus p2 nach Transduktion wurden auf 1 normiert.

Es scheint, dass das durch Nb und NbL hervorgerufene erhöhte Proliferationspotential zu einem selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den Kontrollzellen führte. Zellen in denen Nb und NbL herunterreguliert wurde, wiesen einen selektiven Wachstumsnachteil gegenüber den Kontrollzellen auf. $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen dünnnten sich stärker innerhalb der Mischkultur aus als $HUVEC^{Nb-KD}$ oder $HUVEC^{NbL-KD}$ Zellen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Nb und NbL funktionell redundant wirken können. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Nb und NbL funktionell redundant wirken. Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden HUVECs wiesen gegenüber den Kontrollzellen einen selektiver Wachstumsnachteil auf. Insbesondere der Anteil an Hes1 überexprimierenden Zellen

verringerte sich bereits nach wenigen Tagen. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Komponenten des Notch-Signalwegs sowie eine Herunterregulation der Expression für Nb und NbL zu einem verlängertem Zellzyklus führen oder ob nur noch ein geringer Anteil der Zellen das Potential zur Teilung besitzt. Diesbezüglich wurde das Koloniebildungspotential der Zellen nach Einzelzellablage untersucht.

3.7.1.2 Koloniebildungspotential lentiviral transduzierter HUVECs

In Analogie zur Hämatopoese wird die Fähigkeit Kolonien zu bilden als Maß der Primitivität von endothelialen Vorläuferzellen angesehen (Ingram et al., 2005; Ingram et al., 2004). Um das Koloniebildungspotential von HUVECs zu untersuchen, wurden je untersuchter Zellfraktion 96 einzelne Zellen durchflusszytometrisch in die Vertiefung einer 96-Lochplatte abgelegt. Die Anzahl der Kolonien pro Platte sowie deren jeweilige Größe wurde an Tag 14 ermittelt und gaben retrospektiv Rückschlüsse darauf, wie viele Zellen einer Population Kolonien hervorbringen können.

Unter den gewählten Bedingungen bildeten ca. 50 % der abgelegten Kontrollzellen Kolonien aus (Tab. 20, Abb. 42-A). Von den Nb1-4 überexprimierenden und den dnMAML1 exprimierenden Zellen brachten nach Ablage ca. 60 % und von den NbL überexprimierenden Zellen 64 % der Zellen Kolonien hervor (Tab. 20, Abb. 42-A). Nach Herunterregulation der Expression für Nb oder NbL bildeten durchschnittlich 40-44 % der Zellen Kolonien aus, nach Herunterregulation der Expression für Nb und NbL 20 % der Zellen (Tab. 20, Abb. 42-B). Von den NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen besaß weniger als jede vierte Zelle das Potential Kolonien auszubilden (Tab. 20, Abb. 42A).

Tab. 20 : Prozentualer Anteil an gebildeten Kolonien genetisch manipulierter HUVECs nach Einzelzellablage an Tag 14.

Darstellung der Werte aus 5 unabhängigen Versuchen und deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der Überexpressions-Studien (A) und nach Herunterregulation (B). Alle p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

A)													
d14	Kon [%]	eGFP [%]	Nb1 [%]	Nb2 [%]	Nb3 [%]	Nb4 [%]	NbL [%]	dnMAML1 [%]	NICD1 [%]	Hey1 [%]	Hey2 [%]	Hes1 [%]	
HUVEC 1	58,33	70,83	70,83	54,17	70,83	79,17	64,58	60,42	31,25	33,33	45,83	12,50	
HUVEC 2	64,58	47,92	47,92	68,75	58,33	58,33	66,67	50,00	8,33	16,67	12,50	8,33	
HUVEC 3	58,33	45,83	60,42	50,00	58,33	54,17	77,08	56,25	12,50	8,30	29,17	12,50	
HUVEC 4	30,56	22,22	61,11	50,00	38,89	37,50	52,78	44,44	5,56	19,44	4,17	16,67	
HUVEC 5	50,00	83,33	66,67	70,83	79,17	70,83	62,50	83,33	45,83	25,00	29,17	16,67	
MW	52,36	54,03	61,39	58,75	61,11	60,00	64,72	58,89	20,69	20,55	24,17	13,33	
STABW	11,85	21,25	7,74	9,17	13,64	14,34	7,80	13,38	15,44	8,36	14,53	3,12	
T-Test	p=	0,868	0,316	0,345	0,222	0,261	0,030	0,465	0,025	0,013	0,013	0,006	Kon
			0,473	0,620	0,146	0,280	0,362	0,424	0,002	0,020	0,013	0,019	eGFP
				0,718	0,966	0,835	0,603	0,685	0,002	< 0,001	0,002	< 0,001	Nb1
					0,694	0,861	0,383	0,981	0,005	0,002	0,017	0,001	Nb2
						0,708	0,612	0,527	< 0,001	0,003	0,002	0,002	Nb3
							0,541	0,852	0,001	0,002	0,001	0,004	Nb4
								0,468	0,007	0,003	0,003	< 0,001	NbL
									0,000	0,004	0,006	0,002	dnMAML1
										0,982	0,596	0,368	NICD1
											0,597	0,154	Hey1
												0,223	Hey2

B)						
d14	Kon [%]	shRNA [%]	Nb-KD [%]	NbL-KD [%]	Nb+NbL-KD [%]	
HUVEC 1	58,33	60,54	25,00	41,67	37,50	
HUVEC 2	64,58	60,76	57,45	59,57	13,89	
HUVEC 3	58,33	50,13	77,08	60,42	22,20	
HUVEC 4	30,56	24,25	33,33	44,44	20,83	
HUVEC 5	50,00	53,96	8,33	13,89	4,17	
MW	52,36	49,93	40,24	44,00	19,72	
STABW	13,25	15,05	27,16	18,87	12,24	
T-Test	p=	0,363	0,341	0,382	0,013	Kon
			0,515	0,610	0,023	shRNA
				0,544	0,176	Nb-KD
					0,038	NbL-KD

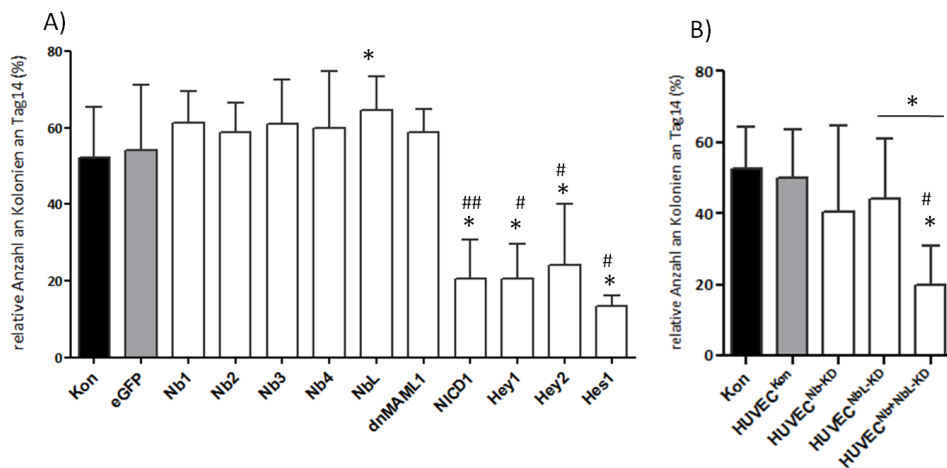


Abb. 42 : Relative Anzahl an Kolonien an Tag 14 nach Einzelzellablage.

Eine erhöhte Anzahl an gebildeten Kolonien konnte bei Nb1-4 und NbL überexprimierenden HUVECs festgestellt werden (n=5) (A). Eine erniedrigte Anzahl an Kolonien bei den mit NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 transduzierten Zellen (n=5) (A). Eine geringe verringerte Anzahl an gebildeten Kolonien wurde bei den HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{NbL-KD} detektiert, eine stark reduzierte Kolonienanzahl bei den HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen (n=5) (B); p ≤ 0,05 wurden mit * bzw. #, p ≤ 0,005 mit ** bzw. ## markiert; * = gegen die unbehandelte Kontrolle, # = gegen die Leervektorkontrolle; Kon: unbehandelte Kontrolle, eGFP: eGFP-Leervektor, Nb: Numb, NbL: Numblike, dnMAML1: dominant negatives Mastermind-like1, NICD1: Notch1^{icd}, HUVEC^{Kon}: shRNA Leervektor, HUVEC^{Nb-KD}: Zellen transduziert mit dem Vektor pTRIPZ-shRNAmir-Numb, HUVEC^{NbL-KD}: Zellen transduziert mit dem Vektor pEGIPZ-shRNAmir-Numblike, sowie doppelt transduzierte Zellen: HUVEC^{Nb+NbL-KD}.

Nb und NbL überexprimierende Zellen bildeten im Mittel häufiger Kolonien aus, als die Kontrollzellen. NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen als auch HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen bildeten weniger Kolonien aus, als die Kontrollzellen. Um Festzustellen, ob diese Zellen eine höhere bzw. niedrigere Teilungsrate aufweisen, wurde im nächsten Schritt die Koloniengröße untersucht.

Hierfür wurden an Tag 14 die gebildeten Kolonien mittels ihrer jeweiligen Zellzahl in die Größen S (1-10 Zellen), M (11-100 Zellen), L (101-300 Zellen), XL (301-1000 Zellen), XXL (1001-10.000 Zellen) und >XXL (>10.000 Zellen) eingeteilt (Abb. 43, Tab. 21).

In fünf unabhängigen Versuchen wiesen die Kontrollzellen und die Nb4 überexprimierenden Zellen eine ähnliche Verteilung der Koloniengrößen auf. Im Mittel ergab sich ein Verhältnis von ca. 1:3/1:4 der kleinen Kolonien (1-100 Zellen) zu den großen Kolonien (1001-10.000 Zellen). Die Nb1 und Nb2 überexprimierenden Zellen wiesen im Mittel ein Verhältnis von 1:1,5 von kleinen zu großen Kolonien auf; die Nb3 überexprimierenden Zellen ein Verhältnis von 1,5:1. Einen ungefähr gleichen Anteil an kleinen und großen Kolonien bildeten die NbL überexprimierenden, die dnMAML1 exprimierenden Zellen und die HUVEC^{Nb-KD} Zellen. Bei den HUVEC^{NbL-KD} Zellen wurden im Mittel ein doppelt so großer Anteil an großen Kolonien im Vergleich zu kleinen Kolonien detektiert. Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen bildeten im Mittel nur kleine Kolonien aus. Die HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen wiesen im Mittel ein Verhältnis von 1:1/1,5:1 von kleinen zu großen Kolonien auf.

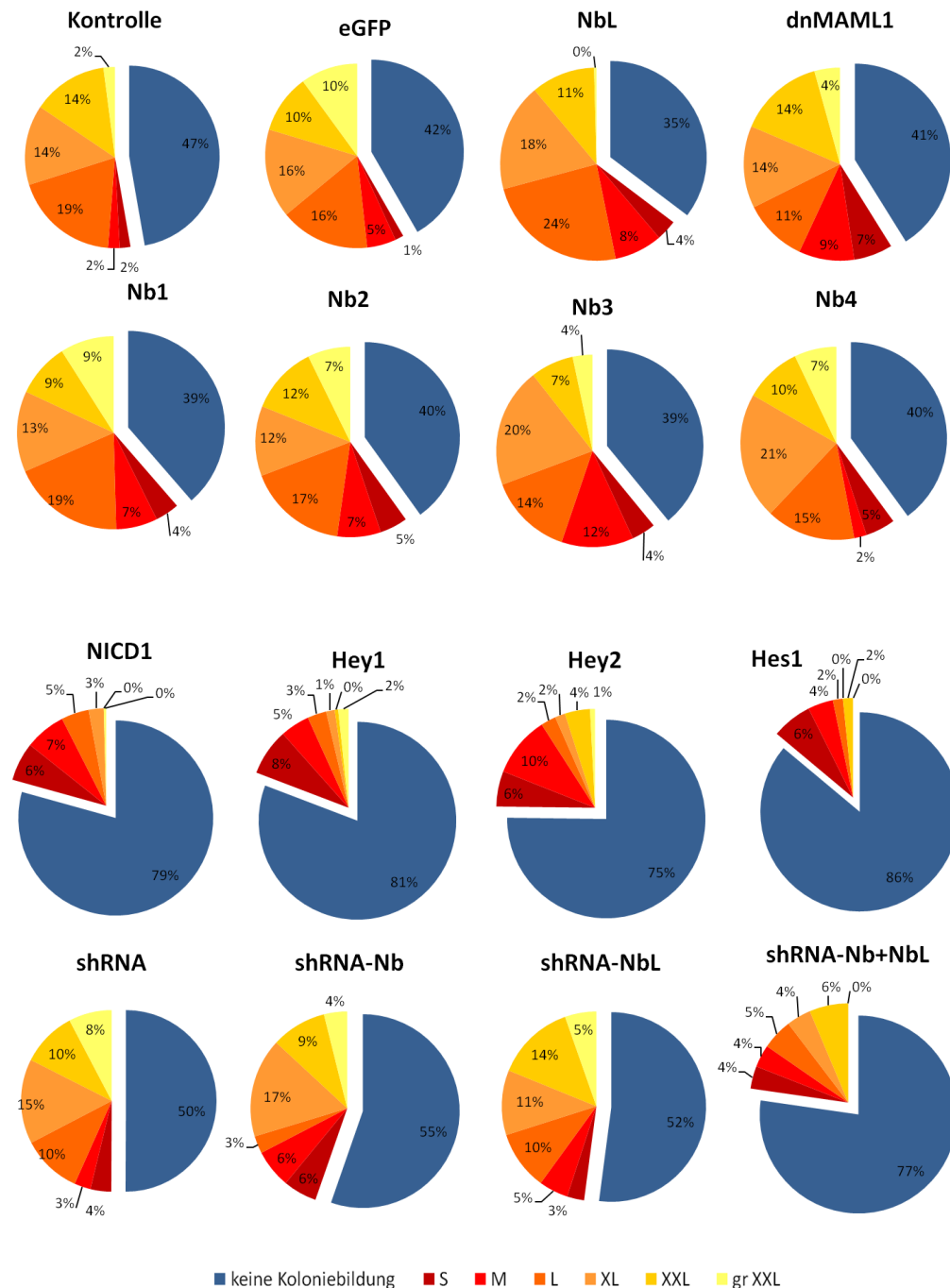


Abb. 43 : Relative Koloniegröße lentiviral transduzierter HUVECs.

Darstellung der relativen Koloniegröße (S, L, M, XL, XXL, >XXL) der von den Kontrollzellen und den Nb1-4, NbL, Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden/ NICD1, dnMAML1 exprimierenden Zellen und HUVEC^{Nb-KD} (shRNA-Nb), HUVEC^{NbL-KD} (shRNA-NbL) und HUVEC^{Nb+NbL-KD} (shRNA-Nb+NbL) gebildeten Kolonien (n=5). Abgesetzt wurde in blau der Anteil an nicht gebildeten Kolonien. Koloniegrößen: S (1-10 Zellen), M (11-100 Zellen), L (101-300 Zellen), XL (301-1000 Zellen), XXL (1001-10.000 Zellen) und >XXL (>10.000 Zellen); Kontrolle: unbehandelte Kontrolle, eGFP: eGFP-Leervektor, Nb: Numb, NbL: Numblike, dnMAML1: dominant negatives Mastermind-like1, NICD1: Notch1^{icd}; shRNA= Leervektor, shRNA-Nb: Zellen transduziert mit dem Vektor pTRIPZ-shRNAmir-Numb, shRNA-NbL: Zellen transduziert mit dem Vektor pEGIPZ-shRNAmir-Numblike, sowie doppelt transduzierte Zellen: shRNA-Nb+NbL

Tab. 21: Verteilung der Koloniengröße genetisch manipulierter HUVECs.Mittelwerte [%] aus 5 unabhängigen Versuchen sowie deren Standardabweichung \pm [%].

MW aus n=5	S [%]	\pm [%]	M [%]	\pm [%]	L [%]	\pm [%]	XL [%]	\pm [%]	XXL [%]	\pm [%]	gr XXL [%]	\pm [%]
Kon	1,94	2,03	2,08	2,64	19,03	6,99	14,44	5,65	13,61	5,57	2,08	3,23
eGFP	1,39	1,76	4,72	4,38	14,58	11,64	14,44	6,77	9,58	10,17	9,31	8,18
Nb1	4,03	3,41	6,94	6,10	18,89	12,15	13,47	7,93	9,03	6,99	9,03	6,05
Nb2	4,86	4,77	7,64	8,31	17,50	8,99	12,22	6,43	11,94	6,59	7,50	7,64
Nb3	4,03	1,11	12,08	9,17	14,03	4,64	20,00	10,42	7,22	6,70	3,33	2,12
Nb4	5,00	2,83	2,08	1,32	15,00	7,26	21,25	5,00	9,58	9,28	7,08	9,28
NbL	3,47	2,78	8,06	4,53	24,03	5,19	18,06	8,95	10,69	3,53	0,42	0,83
dnMAML1	6,53	4,60	9,31	6,16	10,69	11,65	13,75	8,08	14,31	6,70	4,31	3,41
NICD1	6,39	2,42	6,81	7,98	4,58	6,51	2,50	2,04	0,00	0,00	0,42	0,83
Hey1	7,50	4,86	4,72	6,19	3,06	1,62	1,39	1,76	0,56	1,11	1,67	3,33
Hey2	5,83	2,04	10,00	8,98	2,50	3,33	1,67	3,33	4,17	8,33	0,83	1,67
Hes1	6,67	3,33	4,17	2,64	1,67	2,04	0,00	0,00	1,67	2,04	0,00	0,00
tRFP	3,70	0,64	2,92	0,71	10,67	6,40	15,08	8,59	9,85	4,02	7,70	4,00
Nb-KD	6,08	9,36	6,94	4,17	3,15	3,46	17,87	14,02	9,97	6,54	4,20	4,44
NbL-KD	3,15	3,46	5,38	5,39	10,84	6,27	11,89	9,74	14,48	11,24	5,78	4,07
Nb+NbL-KD	3,82	2,28	3,82	5,14	5,21	3,45	4,17	3,11	6,60	8,30	0,00	0,00

3.7.1.3 Beeinflussung der Hierarchie

Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen bildeten die wenigsten Kolonien und wiesen den höchsten Anteil an kleinen Kolonien auf (3.7.1.2). Diese verringerte Teilungsrate deutet auf einen durch Aktivierung des Notch-Signalwegs induzierten post-mitotischen Zustand differenzierter Zellen hin. Um dies zu überprüfen wurde die Oberflächenexpression des in dieser Arbeit qualifizierten Differenzierungsmarkers CD34 und des auf primitiven endothelialen Vorläuferzellen exprimierten Oberflächenantigens CD44 untersucht.

Der Gehalt an CD34⁺ und CD44⁺⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellfraktion eines Ansatzes wurde durchflusszytometrisch in Passage 3 nach Transduktion gemessen. Hierfür wurden Ansätze gewählt, in denen eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen etwa im Verhältnis 1 zu 1 vorlagen. Aufgrund der geringen Anzahl an HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen wurde ihr Anteil für diese Versuche zuvor durchflusszytometrisch angereichert. Die zugrunde liegende Strategie zur Auswertung des Gehalts an CD34⁺ und CD44⁺⁺ Zellen ist in Abb. 44 dargestellt. Hierbei erfolgte zuerst eine Diskriminierung zwischen den eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen innerhalb eines Ansatzes (Abb. 44-A). Daraufhin wurde der Anteil CD34⁺ (Abb. 44-B) und CD44⁺⁺ (Abb. 44-C) Zellen innerhalb der eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellfraktion miteinander verglichen. Die Oberflächenexpression von CD34 auf den HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen

konnte mit den zur Zeit der Durchführung zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht gemessen werden.

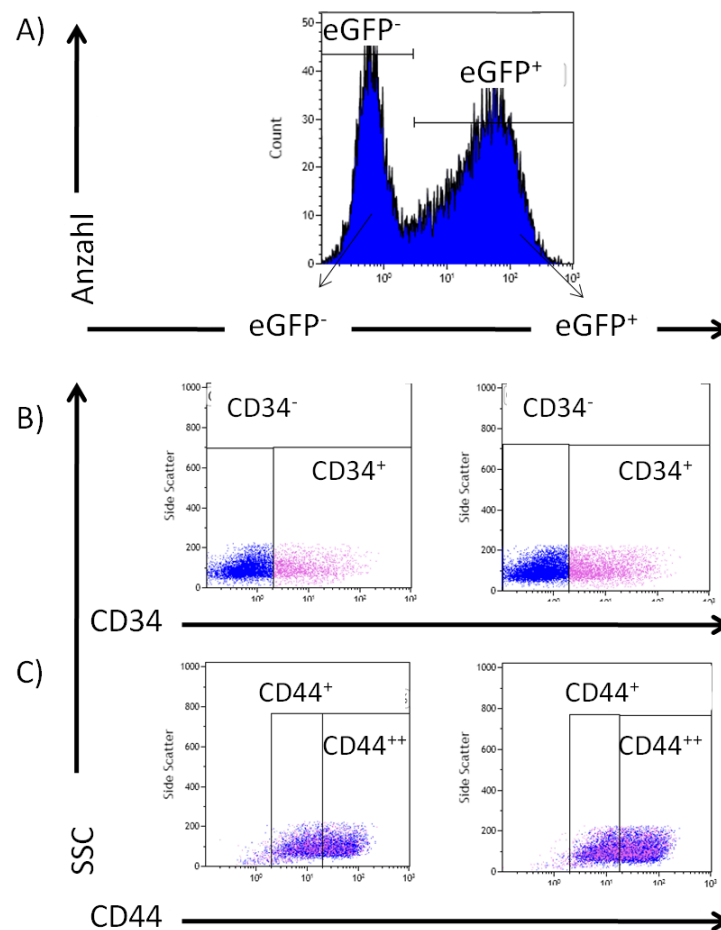


Abb. 44 : Strategie zur Auswertung des Gehalts an CD34⁺ und CD44⁺⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellfraktion.

(A) Diskriminierung erfolgreich transduzierter (eGFP⁺) und nicht transduzierter (eGFP⁻) Zellen innerhalb eines Ansatzes. **(B)** Zellen, welche kein CD34 auf ihrer Oberfläche exprimierten wurden als CD34 negative (CD34⁻) Zellfraktion, Zellen welche CD34 exprimierten als CD34 positive (CD34⁺) Zellfraktion bezeichnet. **(C)** Aufgrund der in der Population gefundenen heterogenen Verteilung der Oberflächenexpression von CD44, wurden die Zelle in CD44 positiv (CD44⁺) und CD44 stark positiv (CD44⁺⁺) unterteilt. Durchflusszytometrische Darstellung eines repräsentativen Versuchs von 5 durchgeführten Versuchen.

Anteil CD44⁺⁺ Zellen. Der Anteil an CD44⁺⁺ exprimierenden Zellen innerhalb eines Ansatzes aus eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen wich im Mittel bei den eGFP (neg/pos=83,6 % ± 18,15 %/84,6 % ± 13,22 %) und dnMAML1 (neg/pos=83,00 % ± 17,61 %/85,6 % ± 16,61 %) exprimierenden Zellen geringfügig voneinander ab (Abb. 45-A, Tab. 22). Im Mittel exprimierte ein erhöhter Anteil an Nb1-4 und NbL überexprimierenden Zellen CD44⁺⁺ gegenüber der eGFP⁻ Zellfraktion (Abb. 45-A, Tab. 22). Beispielsweise wiesen im

Ansatz der Nb4 überexprimierenden Zellen im Mittel 89,00 % ($\pm 16,49$ %) der eGFP⁺ Zellen eine CD44⁺⁺ Expression auf, jedoch nur 80,6 % ($\pm 22,95$ %) der eGFP⁻ Zellfraktion ($p=0,045$) (Abb. 45-A, Tab. 22). Nach Herunterregulation der Expression von Nb, NbL oder beidem, veränderte sich im Mittel nicht der Anteil an CD44⁺⁺ exprimierenden Zellen zwischen den transduzierten und nicht transduzierten Zellen (Abb. 45-A, Tab. 22). Ein leicht erhöhter Gehalt an CD44⁺⁺ exprimierenden Zellen wurde bei den mit Hey1, Hey2 und Hes1 transduzierten HUVECs festgestellt. Ein leicht erniedrigter Gehalt an CD44⁺⁺ exprimierenden Zellen wurde im Mittel bei den NICD1 exprimierenden Zellen mit 79,60 % ($\pm 23,49$ %) zu der eGFP⁻ Zellfraktion mit 85,00 % ($\pm 17,09$ %) ermittelt.

Tab. 22 : Vergleich des Anteils [%] an CD44⁺⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁻ und eGFP⁺ Zellfraktion.

Die Ermittlung der Werte erfolgte durchflusszytometrisch ($n=5$); MW=Mittelwert, STABW=Standardabweichung, p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

HUVEC	1 [%]	2 [%]	3 [%]	4 [%]	5 [%]	MW [%]	STABW [%]	p=
CD44 ⁺⁺	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	eGFP ⁺ [eGFP]	
eGFP	96 [95]	96 [97]	81 [74]	86 [96]	64 [56]	84,6 [83,6]	13,2 [18,2]	0,773
Numb1	93 [89]	99 [94]	85 [78]	99 [95]	65 [47]	88,2 [80,6]	14,2 [20,0]	0,046
Numb2	100 [98]	100 [97]	88 [76]	97 [93]	60 [46]	89,0 [82,0]	16,9 [22,0]	0,048
Numb3	98 [93]	99 [94]	95 [89]	94 [90]	60 [42]	89,2 [81,6]	16,5 [22,2]	0,044
Numb4	98 [92]	98 [92]	98 [94]	91 [85]	60 [40]	89,00 [80,6]	16,5 [23,0]	0,045
NbL	88 [47]	100 [98]	95 [90]	91 [97]	62 [19]	87,2 [70,2]	14,8 [35,5]	0,176
dnMAML1	89 [73]	99 [99]	95 [91]	88 [95]	57 [57]	85,6 [83,0]	16,6 [17,6]	0,530
NICD1	86 [91]	99 [99]	71 [77]	99 [99]	43 [59]	79,6 [85,0]	23,5 [17,1]	0,139
Hey1	95 [94]	100 [100]	73 [41]	96 [98]	36 [40]	80,0 [74,6]	26,8 [31,2]	0,466
Hey2	97 [94]	100 [100]	86 [72]	96 [97]	42 [42]	84,2 [81,0]	24,2 [24,4]	0,314
Hes1	92 [88]	94 [99]	76 [54]	100 [97]	32 [36]	78,8 [74,8]	27,6 [28,2]	0,456
NbL-KD	99 [99]	92 [89]	91 [88]	83 [83]	84 [77]	89,8 [87,1]	6,7 [8,1]	0,125
Nb-KD	100 [100]	97 [97]	95 [92]	60 [60]	92 [86]	88,6 [86,9]	16,3 [16,1]	0,185
Nb+NbL-KD	-	98 [96]	96 [93]	82 [83]	83 [73]	89,9 [86,3]	8,3 [10,2]	0,242

Anteil CD34⁺ Zellen. Der Anteil an CD34⁺ Zellen innerhalb eines Ansatzes aus eGFP⁻ und eGFP⁺ Zellen war bei den eGFP, Nb1-4, NbL und dnMAML1 transduzierten Zellen gleich verteilt (Abb. 45-B, Tab. 23). Der Gehalt an CD34 exprimierenden Zellen innerhalb der eGFP⁻ und eGFP⁺ Zellfraktion NbL- und dnMAML1- transduzierter Zellen war im Vergleich zur eGFP-Kontrolle geringer (Abb. 45-B, Tab. 23). Nach Herunterregulation von NbL exprimierte im Mittel im Vergleich zu den eGFP⁻ Zellen (8,7 % \pm 5,9 %;

p=0,022) ein erhöhter Anteil der HUVEC^{NbL-KD} Zellen CD34 (17,7 % ± 10,1 %; n=5) (Abb. 45-B, Tab. 23).

Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen exprimierten im Mittel mehr CD34 im Vergleich zu den nicht transduzierten Zellen (Abb. 45-B, Tab. 23). So exprimierten beispielsweise 39,8 % (± 18,7 %) der NICD1 überexprimierenden Zellen CD34, wohingegen nur 13,0 % (± 9,8 %) der eGFP⁻ Zellen CD34 exprimierten (p=0,011). Die Hey1 transduzierten Zellen wiesen ein Verhältnis von 35,8 % (± 25,6 %) CD34⁺ Zellen zu 14,6 % (± 11,4 %) CD34⁺ Zellen der eGFP⁻ Zellen auf (p=0,049).

Tab. 23: Vergleich des Anteils an CD34⁺ Zellen [%] innerhalb der eGFP⁻ und eGFP⁺ Zellfraktion.

Die Ermittlung der Werte erfolgte durchflusszytometrisch (n=5); MW=Mittelwert, STABW=Standardabweichung, p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

HUVEC CD34 ⁺	1 [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	2 [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	3 [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	4 [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	5 [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	MW [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	STABW [%] eGFP ⁺ [eGFP ⁻]	p=
eGFP	7 [4]	17 [12]	37 [26]	6 [11]	27 [20]	18,8 [14,6]	13,3 [8,5]	0,189
Numb1	5 [4]	15 [12]	23 [13]	4 [12]	28 [30]	15,0 [14,2]	10,7 [9,6]	0,800
Numb2	3 [2]	11 [11]	23 [15]	5 [9]	29 [29]	14,2 [13,2]	11,4 [10,0]	0,635
Numb3	7 [4]	18 [13]	27 [14]	7 [11]	37 [39]	19,2 [16,2]	13,0 [13,3]	0,372
Numb4	9 [5]	18 [14]	20 [13]	16 [11]	19 [35]	16,4 [15,6]	4,4 [11,4]	0,859
NbL	3 [10]	9 [7]	15 [10]	9 [9]	8 [22]	8,8 [11,6]	4,3 [5,9]	0,460
dnMAML1	8 [10]	6 [4]	16 [10]	7 [9]	20 [15]	11,4 [9,6]	6,2 [3,9]	0,346
NICD1	45 [5]	34 [7]	45 [21]	12 [6]	63 [26]	39,8 [13,0]	18,7 [9,8]	0,011
Hey1	16 [6]	25 [5]	69 [22]	12 [9]	57 [31]	35,8 [14,6]	25,6 [11,4]	0,049
Hey2	6 [6]	14 [6]	34 [24]	12 [9]	53 [49]	23,8 [18,8]	19,4 [18,5]	0,049
Hes1	21 [11]	14 [5]	41 [24]	23 [7]	60 [49]	31,8 [19,2]	18,7 [18,2]	0,002
NbL-KD	2 [1]	27 [11]	16 [5]	27 [17]	17 [10]	17,7 [8,7]	10,1 [5,9]	0,022
Nb-KD	-	-	-	-	-	-	-	-
Nb+NbL-KD	-	-	-	-	-	-	-	-

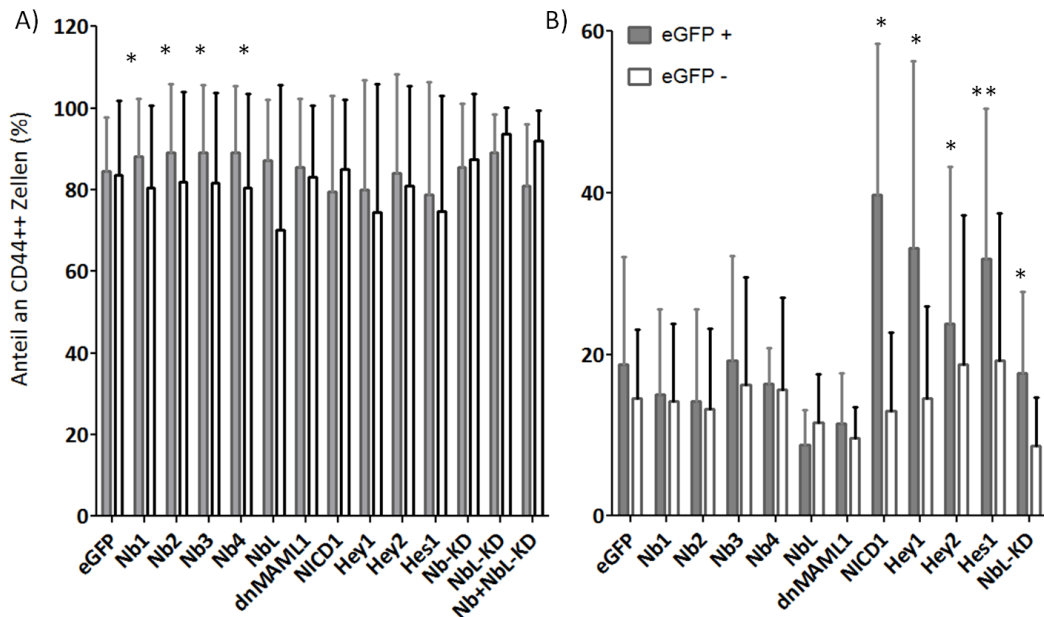


Abb. 45: Anteil der CD44⁺⁺ und CD34⁺ exprimierenden Zellen.

Anteil [%] der CD44⁺⁺ (A) und CD34⁺ (B) exprimierenden Zellen von genetisch manipulierten (grauer Balken) und nicht manipulierten (weißer Balken) Zellen innerhalb eines Ansatzes in Passage 5 nach Transduktion (n=5). Im Mittel exprimierten die mit Nb1, Nb2, NbL und dnMAML1 transduzierten Zellen weniger CD34. Bei den mit NbL und dnMAML1 transduzierten Zellen exprimierte auch die eGFP-Zellfraktion weniger CD34 im Vergleich zu der Leervektorkontrolle. Die NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1 transduzierten Zellen exprimierten im Mittel mehr CD34. Bei den Nb1-4 transduzierten Zellen exprimierte ein erhöhter Anteil an Zellen CD44⁺⁺ im Vergleich zu den eGFP⁻ Zellen. eGFP: eGFP⁻ Leervektor, Nb: Numb, NbL: Numblike, dnMAML1: dominant negatives mastermind like1, NICD1: Notch1^{icd}, NbL-KD: Zellen transduziert mit dem Vektor pEGIPZ-shRNAmir-Numblike ; * = p ≤ 0,050; ** = p ≤ 0,001 (p-Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

Ein erhöhter Anteil CD34⁺ Zellen konnte in der Zellfraktion der NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Der Arbeitshypothese zugrunde liegend wird CD34 auf differenzierten endothelialen Vorläuferzellen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs die Differenzierung dieser Zellen induziert.

Im Mittel exprimierten mehr Nb1-4 und NbL überexprimierende Zellen CD44⁺⁺ als die Zellen der eGFP⁻ Zellfraktion. Es stellte sich die Frage, ob Nb und NbL die Primitivität der Zellen erhält, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass sich die primitivsten Zellen in der CD44⁺⁺ Zellfraktion befinden. Nach Herunterregulation von NbL exprimierte ein erhöhter Anteil der Zellen CD34, wodurch die Annahme, dass NbL einen Einfluss auf die Primitivität der Zellen ausübt, bestätigt wurde.

3.7.2 Interaktion von Numb und Notch

Mögliche Interaktionen von Nb/NbL und den Komponenten des Notch-Signalwegs wurden auf RNA-Ebene betrachtet, um zu untersuchen, ob Nb/NbL modulativ auf den Notch-Signalweg wirken.

In fünf unabhängigen Versuchen wurden 10-20.000 eGFP⁺ bzw. tRFP⁺ Zellen durchflusszytometrisch separiert und mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von Nb, NbL, Hey1 und Hes1 in diesen Zellen quantifiziert. In 3 von 5 Experimenten wurde keine ausreichende Menge an Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen isoliert, da diese Zellen einem starken selektiven Wachstumsnachteil unterlagen (siehe hierzu auch Abschnitt 3.7.1.1, S.106).

Numb. In den Nb1-4 überexprimierenden Zellen wurde eine Erhöhung für Numb kodierende RNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und Leervektorkontrolle detektiert (Tab. 24-A, Abb. 46-A). Dieser Nachweis wurde als interne Kontrolle für die verwendeten Konstrukte gewertet, da eine Überexpression auf RNA-Ebene nachzuweisen war. Entsprechend wurde in den HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen ein erniedrigter Gehalt an Numb kodierender RNA gemessen (Abb. 46-E). Bei den NbL und Hey1 überexprimierenden als auch dnMAML1 exprimierenden Zellen wurde ein ähnlicher Gehalt an Numb kodierender RNA detektiert. Teilweise wurde in den NICD1 exprimierenden Zellen eine erhöhte Expression an Numb kodierender RNA festgestellt (Tab. 24-A, Abb. 46-A).

Numbl-like. In den NbL überexprimierenden HUVECs wurde eine stärkere Expression von Numbl-like kodierender RNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und Leervektorkontrolle gemessen (Tab. 24-B, Abb. 46-B). Dies wurde als interne Kontrolle des verwendeten Konstrukts gewertet, da eine Überexpression von Numbl-like kodierender RNA auf RNA-Ebene nachzuweisen war. Die HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen exprimierten weniger Numbl-like kodierender RNA, die HUVEC^{Nb-Ko} Zellen exprimierten mehr Numbl-like kodierender RNA im Vergleich zu den Kontrollzellen (Tab. 24-B, Abb. 46-E). Eine leicht erhöhte Expression von Numbl-like kodierender RNA wurde teilweise in den Nb1, Nb3 und dnMAML1 sowie in den NICD1 und den mit Hey1 transduzierten Zellen gemessen (Tab. 24-B, Abb. 46-B). Eine im Mittel höhere

Expression für Numblike kodierende RNA wurde bei den Nb4 überexprimierenden und den dnMAML1 exprimierenden HUVECs im Vergleich zu den Nb2 überexprimierenden Zellen detektiert (Tab. 24-B).

Hes1. Die Nb2, Nb4, NbL überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden Zellen exprimierten im Mittel weniger Hes1 kodierender RNA (Abb. 46-C, Tab. 24-C). Die Hey1 überexprimierenden Zellen wiesen die geringste Expression von Hes1 kodierender RNA auf (Tab. 24-C). Die NICD1 exprimierenden HUVECs (Tab. 24-C, Abb. 46-C) und die HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen (Tab. 24-C, Abb. 46-F) exprimierten am meisten Hes1 kodierender RNA.

Hey1. Die Nb1, Nb2, Nb4, NbL überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden HUVECs exprimierten im Vergleich zu den Kontrollen weniger Hey1 kodierende RNA (Tab. 24-D). Eine erhöhte Expression für Hey1 kodierende RNA wiesen die NICD1 und Hey1 transduzierten Zellen (Tab. 24-D, Abb. 46-D) als auch die HUVEC^{Nb-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen auf (Tab. 24-D, Abb. 46-F).

Tab. 24: Relative Expression der RNA normalisiert auf die Kontrollzellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (STABW) aus fünf bzw. vier unabhängigen Versuchen; p-Werte wurden über den Students T-test (beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche) ermittelt.

A)														
Numb	Kon	eGFP	Nb1	Nb2	Nb3	Nb4	NbL	dnMAML1	NICD1	Hey1	Nb-KD	NbL-KD	Nb+NbL-KD	
MW (n=5)	1,00	0,97	8,57	10,58	6,29	10,47	0,97	1,15	10,46	1,35	0,44	0,72	0,41	
STABW	0,00	0,26	4,58	6,28	4,02	5,30	0,19	0,25	16,50	0,67	0,19	0,21	0,20	
T-Test p=		0,799	0,021 0,023	0,027 0,029 0,150	0,042 0,039 0,344 0,188	0,016 0,017 0,254 0,955 0,030	0,774 0,952 0,021 0,027 0,038 0,015	0,248 0,420 0,019 0,025 0,043 0,015 0,296	0,269 0,273 0,764 0,982 0,624 0,998 0,271 0,271	0,300 0,160 0,027 0,031 0,040 0,017 0,553 0,291	0,009 0,051 0,052 0,046 0,081 0,044 0,006 0,261 0,049	0,122 0,132 0,058 0,051 0,092 0,049 0,031 0,058 0,271 0,065 0,039	0,010 0,016 0,056 0,049 0,089 0,049 0,015 0,031 0,262 0,038 0,837 0,040	Kon eGFP Nb1 Nb2 Nb3 Nb4 NbL dnMAML1 NICD1 Hey1 Nb-KD NbL-KD
B)														
NumbLike	Kon	eGFP	Nb1	Nb2	Nb3	Nb4	NbL	dnMAML1	NICD1	Hey1	Nb-KD	NbL-KD	Nb+NbL-KD	
MW (n=5)	1,00	1,02	1,38	0,85	1,25	1,01	148,51	1,37	6,09	2,92	1,50	0,34	0,57	
STABW	0,00	0,23	1,14	0,22	0,56	0,29	140,23	0,48	5,84	3,25	0,72	0,18	0,34	
T-Test p=		0,828	0,497 0,526	0,185 0,155 0,332	0,384 0,460 0,851 0,140	0,942 0,925 0,517 0,042 0,236	0,078 0,078 0,077 0,078 0,079 0,078	0,154 0,189 0,987 0,030 0,730 0,126 0,078	0,123 0,135 0,146 0,119 0,140 0,127 0,085 0,146	0,257 0,252 0,388 0,219 0,319 0,248 0,082 0,337 0,401	0,258 0,232 0,804 0,136 0,737 0,282 0,134 0,441 0,169 0,987	0,025 0,011 0,157 0,035 0,092 0,048 0,133 0,020 0,117 0,104 0,024	0,085 0,241 0,300 0,415 0,196 0,264 0,133 0,116 0,111 0,104 0,110 0,355	Kon eGFP Nb1 Nb2 Nb3 Nb4 NbL dnMAML1 NICD1 Hey1 Nb-KD NbL-KD
C)														
Hes1	Kon	eGFP	Nb1	Nb2	Nb3	Nb4	NbL	dnMAML1	NICD1	Hey1	Nb-KD	NbL-KD	Nb+NbL-KD	
MW (n=5)	1,00	0,78	0,78	0,70	0,73	0,76	0,76	0,42	9,19	0,25	3,07	0,80	4,10	
STABW	0,00	0,19	0,27	0,20	0,43	0,19	0,16	0,17	6,70	0,25	2,04	0,30	2,50	
T-Test p=		0,060	0,149 0,989	0,029 0,379 0,441	0,226 0,785 0,766 0,863	0,044 0,677 0,789 0,119 0,844	0,028 0,729 0,853 0,197 0,817 0,914	0,001 0,001 0,048 0,004 0,115 0,001 0,000	0,052 0,048 0,053 0,048 0,050 0,049 0,043	0,003 0,011 0,021 0,046 0,166 0,024 0,028 0,301 0,040	0,136 0,097 0,119 0,092 0,093 0,098 0,096 0,071 0,074 0,072	0,279 0,739 0,599 0,228 0,056 0,460 0,523 0,074 0,080 0,141 0,119	0,090 0,074 0,081 0,071 0,065 0,073 0,072 0,057 0,215 0,063 0,634 0,081	Kon eGFP Nb1 Nb2 Nb3 Nb4 NbL dnMAML1 NICD1 Hey1 Nb-KD NbL-KD
D)														
Hey1	Kon	eGFP	Nb1	Nb2	Nb3	Nb4	NbL	dnMAML1	NICD1	Hey1	Nb-KD	NbL-KD	Nb+NbL-KD	
MW (n=5)	1,00	0,99	0,58	0,60	0,94	0,65	0,63	0,60	84,71	1315,16	2,31	1,02	5,76	
STABW	0,00	0,17	0,32	0,58	0,81	0,36	0,23	0,33	108,30	1349,74	0,80	0,19	2,96	
T-Test p=		0,862	0,041 0,025	0,197 0,208 0,893	0,873 0,892 0,227 0,231	0,096 0,119 0,553 0,802 0,266	0,021 0,037 0,802 0,888 0,378 0,893	0,052 0,080 0,158 1,000 0,284 0,665 0,728	0,159 0,159 0,158 0,158 0,158 0,157 0,157	0,095 0,095 0,095 0,095 0,095 0,095 0,095	0,046 0,068 0,025 0,018 0,093 0,028 0,018 0,014 0,193 0,116	0,883 0,827 0,022 0,013 0,542 0,103 0,002 0,007 0,189 0,116 0,030	0,049 0,042 0,032 0,036 0,041 0,043 0,037 0,039 0,211 0,116 0,131 0,047	Kon eGFP Nb1 Nb2 Nb3 Nb4 NbL dnMAML1 NICD1 Hey1 Nb-KD NbL-KD

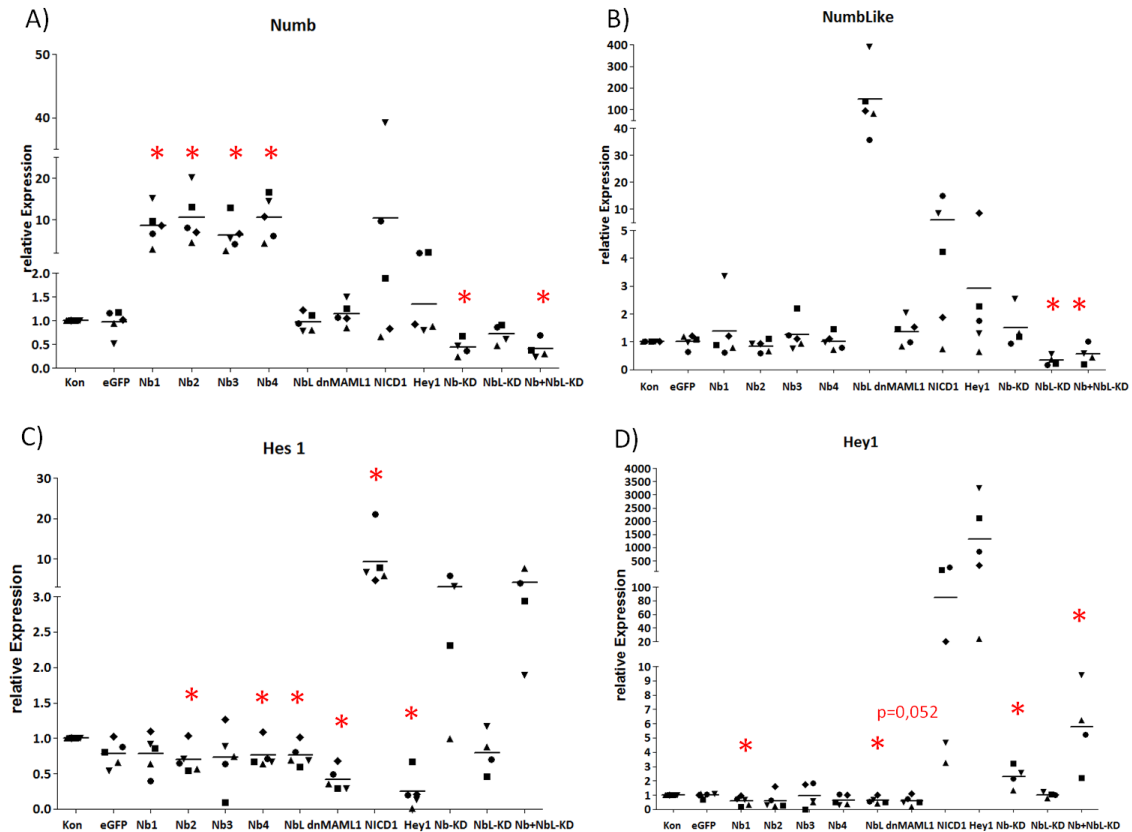


Abb. 46: Darstellung der relativen RNA-Expression normalisiert auf die Kontrollzellen.

In 5 unabhängigen Versuchen exprimierten alle Nb1-4 überexprimierenden HUVECs eine erhöhte Menge für Numb kodierende RNA. Eine erniedrigte Expression von Numb kodierender RNA wiesen die $HUVEC^{Nb-KD}$ und $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (A). Die NbL überexprimierenden HUVECs exprimierten mehr Numblike kodierende RNA; weniger exprimierten die $HUVEC^{NbL-KD}$ und $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen (B). Die dnMAML1, NICD1 und Hey1 transduzierten Zellen und $HUVEC^{Nb-KD}$ Zellen exprimierten mehr Numblike kodierende RNA als die Kontrollzellen (B). Eine geringere Expression von Hes1 kodierender RNA wiesen die Nb2, Nb3, Nb4, NbL und Hey1 überexprimierenden Zellen als auch dnMAML1 exprimierenden Zellen auf; eine erhöhte Expression wurde bei den NICD1 überexprimierenden Zellen und den $HUVEC^{Nb-KD}$ und $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen detektiert (C). NICD1 und Hey1 überexprimierende Zellen als auch $HUVEC^{Nb-KD}$ und $HUVEC^{Nb+NbL-KD}$ Zellen exprimierten verstärkt Hey1 kodierende RNA; Nb1, Nb2, Nb4, NbL überexprimierende und dnMAML1 exprimierende Zellen exprimierten weniger Hey1 kodierende RNA als die Kontrollzellen (D). Zur Kennzeichnung der verwendeten HUVECs (1-5) wurde jeweils ein Symbol verwendet; $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle wurde mit * dargestellt (p -Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt); Mittelwerte wurden durch einen horizontalen Strich gekennzeichnet.

Nb überexprimierende Zellen exprimierten weniger kodierende RNA für die Notch Zielgene Hes1 und Hey1; nach Herunterregulation der Expression von Numb exprimierten diese Zellen mehr Hes1 und Hey1 kodierende RNA. Dies deutet auf einen inhibierenden Einfluss von Numb auf die Aktivierung des Notch-Signalwegs hin.

Numbl-like überexprimierende Zellen exprimierten ebenfalls weniger Hes1 und Hey1 kodierende RNA, jedoch veränderte sich der Gehalt an Hes1 und Hey1 kodierende RNA nach Herunterregulation der Expression von Numbl-like nicht. Nach Herunterregulation der Expression von Numb exprimierten diese Zellen mehr Numbl-like kodierende RNA als die Kontrollzellen. Numbl-like herunterregulierte Zellen exprimierten weniger Numb kodierende RNA als die Kontrollzellen.

3.8 Nachweis des Angiogenesepotentials *in vitro* mittels Matrigel

Gefäßsysteme bestehen aus den gefäßbildenden *Stalk*-Zellen und den verzweigungsbildenden *Tip*-Zellen (Gerhardt et al., 2003; Gerhardt et al., 2004). Notch1 und Dll4 sind an der Entscheidung *Tip*- vs. *Stalk*-Zelle beteiligt (Herbert and Stainier, 2011). In diesem Entscheidungsprozess wird der Notch-Ligand Dll4 stärker in *Tip*-Zellen (Claxton and Fruttiger, 2004; Hellstrom et al., 2007b) als in *Stalk*-Zellen exprimiert, wohingegen in *Stalk*-Zellen der Notch-Signalweg stark aktiviert vorliegt (Hellstrom et al., 2007b; Hofmann and Iruela-Arispe, 2007).

Die Ausbildung von *Tip*- und *Stalk*-Zellen beruht auf einem wechselseitigen Prozess. Durch die Stimulation von VEGF-A wird die Expression des Notch-Liganden Dll4 auf stimulierten Endothelzellen induziert. Durch eine VEGF-A-Notch Rückkopplungsschleife beginnen die Zellen, die ein hohes Notch-Signal empfangen haben, die Transkription des VEGF-R2 zu unterdrücken. Diejenigen Zellen, die eine geringe Menge an Notch-Signalen erhalten haben, zeigen eine erhöhte Expression des VEGF-R2. Infolgedessen wird durch einen aktiven Notch-Signalweg die Bildung einer *Stalk*-Zelle induziert. Durch die anhaltende Expression des Notch-Liganden Dll4 bewirkt die *Tip*-Zelle eine Aufrechterhaltung des aktivierten Notch-Signalwegs in ihren benachbarten Zellen. Dies führt wiederum dazu, dass diese als *Stalk*-Zellen erhalten bleiben (Herbert and Stainier, 2011) (Abb. 48-B). Ebenfalls führt die Aktivierung des Notch-Signalwegs in der Zelle zur Bildung von Kollagen IV und Laminin, dass sich an die *Stalk*-Zellen anlagern und zur Stabilität und Integrität derer beitragen (Benedito et al., 2008; Leong et al., 2002; Trindade et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Notch-Signals eine erhöhte Teilung und Bildung der *Tip*-Zellen bewirkt, wodurch eine

verstärkte Gefäßaussprossung und Verzweigung stattfindet (Hellstrom et al., 2007b; Sainson et al., 2005) (Abb. 48-A). Eine erhöhte Menge an aktiviertem Notch reduziert die Ausbildung von *Tip*-Zellen und inhibiert somit den Prozess des Gefäßauswachsens und die Bildung von Verzweigungen (Sainson et al., 2005) (Abb. 48-C).

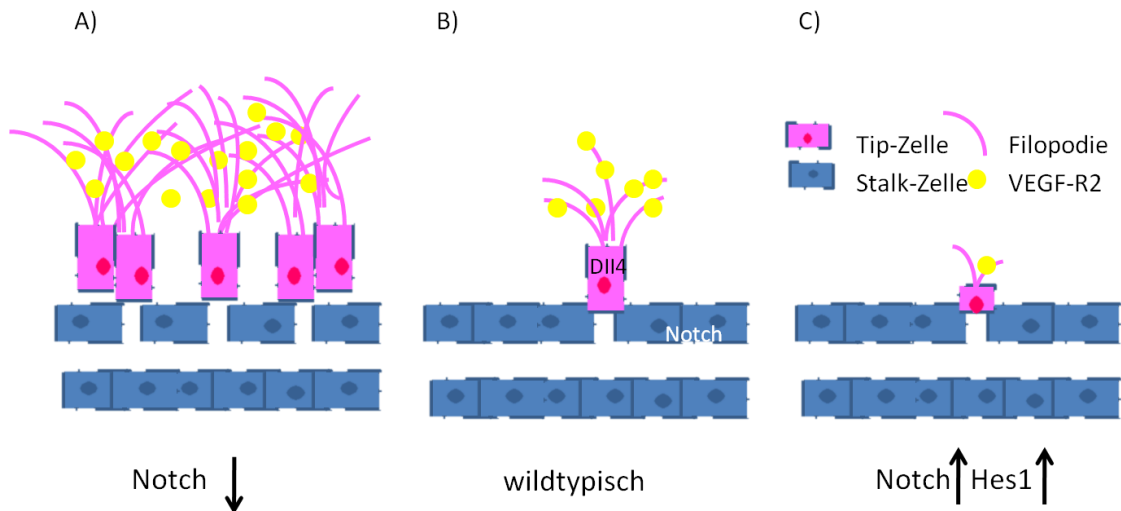


Abb. 47 : Regulierung der Tip-/Stalk-Zell Spezifizierung durch den Notch-Signalweg.

Der Notch Ligand Dll4 ist stärker in Tip-Zellen nachzuweisen, als in Notch aktiven Stalk-Zellen (**B**). Eine Überexpression von Notch bewirkt die Reduktion von Tip-Zellen und inhibiert den Prozess des Gefäßauswachsens und der Bildung von Verzweigungen (**C**). Das Fehlen des Notch-Signals bewirkt eine erhöhte Teilung und Bildung der Tip-Zellen, wodurch eine verstärkte Gefäßaussprossung und Verzweigung stattfindet (**A**). Ebenfalls werden die Filopodien der Tip-Zellen stärker ausgeprägt. (Abbildung modifiziert nach (Phng and Gerhardt, 2009)).

Nachdem die Überexpression der Komponenten des Notch-Signalwegs zu einer verringerten Proliferation und einem erhöhten Anteil an CD34⁺ Zellen führte, stellte sich die Frage, ob die Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel ebenfalls dadurch beeinflusst wird.

Es wurden jeweils 40.000 genetisch manipulierte HUVECs auf vollwertiges Matrigel ausgesät und nach 15 h mikroskopisch dokumentiert (Abb. 48). Im Matrigel bilden die HUVECs tubulärartige Strukturen, die sich zu einem Netzwerk verbinden. Die Parameter tubulärartige Strukturen, Verzweigungspunkte und Ausbildung von Schleifen wurden retrospektiv durch die Firma Wimasis pro Bildausschnitt (1790,5 µm x 1341,6 µm) ermittelt, da keine entsprechende Auswertetechnik zur Verfügung stand.

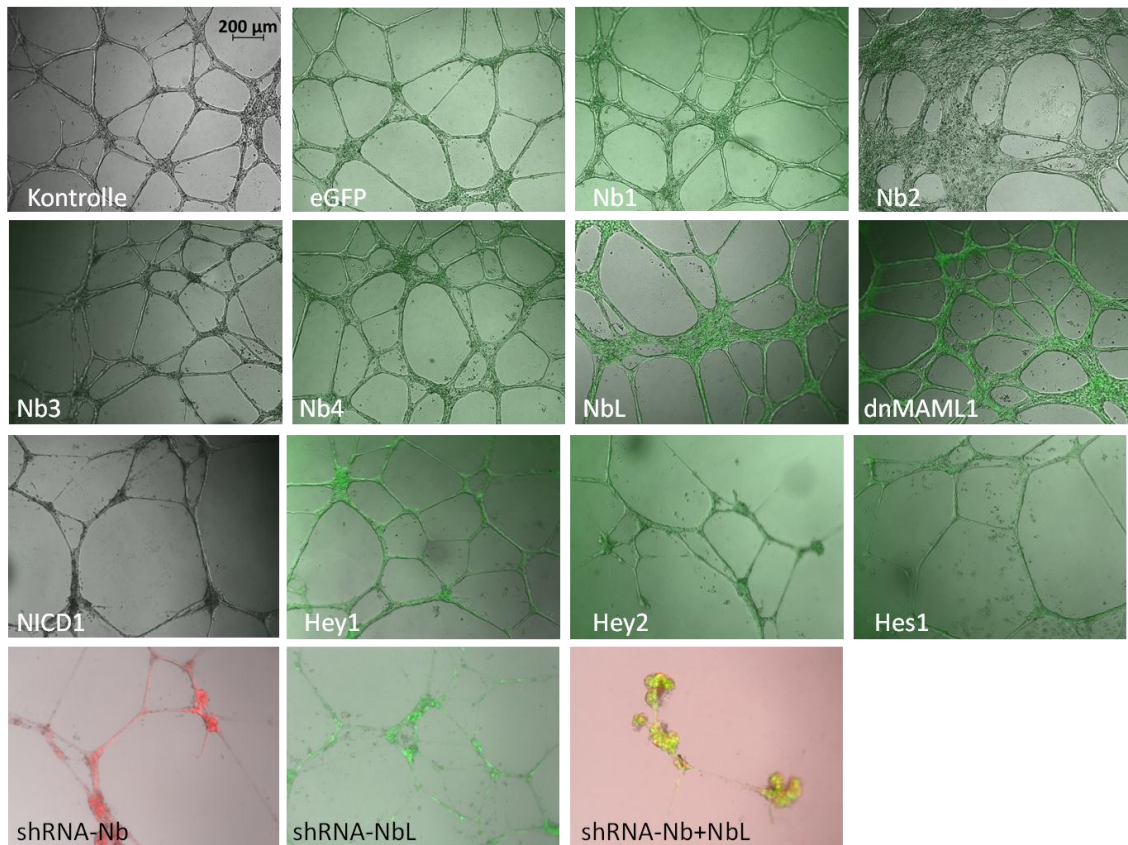


Abb. 48 : Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel.

Bildung tubulärartiger Strukturen im Matrigel der Kontrollzellen (Kontrolle, eGFP) und Numb (1-4), NbL, NICD1, Hey1, Hey2, Hes1 überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden HUVECs (n=5) als auch von Zellen, in denen die Expression von Nb und NbL herunterreguliert wurde (shRNA-Nb, shRNA-NbL, shRNA-Nb+NbL) (n=4). Jeweils 40.000 Zellen wurden auf das vollwertige Matrigel ausplattiert und nach 15 h mikroskopisch dokumentiert; eGFP: eGFP-Leervektor, Nb: Numb, NbL: Numblike, dnMAML1: dominant negatives Mastermind-like1, NICD1: Notch^{icd}; Phasenkontrast.

Im Mittel bildeten die Nb1-3 überexprimierenden Zellen und die eGFP-Kontrollzellen eine ähnliche Anzahl an Verzweigungspunkten, tubulärartigen Strukturen mit durchschnittlich vergleichbaren Längen (µm) (Tab. 25-A, B, C; Abb. 49-A, B). Die Nb4, NbL, NICD1 und Hey1 überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden Zellen bildeten im Mittel 6-12 tubulärartige Verzweigungen weniger, die im Durchschnitt ca. 7 µm kürzer waren als diejenigen der Kontrollzellen (Tab. 25-A, B; Abb. 49-A, B). Diese Zellen (mit der Ausnahme von Nb4) verzweigten sich im Mittel 5-10 Verzweigungspunkte weniger als die Kontrollzellen (Tab. 25-C; Abb. 49-C). Die Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen als auch die HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen bildeten im Durchschnitt weniger als halb so viele Verzweigungspunkte und tubulärartige Strukturen im Vergleich zu den Kontrollzellen

aus (Tab. 25-A, C; Abb. 49-A, C). Im Mittel wurden bei den Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen kürzere tubulärartige Strukturen und bei den HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen längere tubulärartige Strukturen ausgebildet (Tab. 25-B; Abb. 49-B). Die Anzahl an gebildeten Schlaufen bei den Kontrollzellen und den Nb1, Nb2, NbL überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden Zellen variierte geringfügig (Tab. 25-D; Abb. 49-D). Die Nb3 und Nb4 überexprimierenden Zellen formten im Mittel 1-2 Schlaufen mehr aus; die NICD1 exprimierenden und Hey1 und Hes1 überexprimierenden Zellen im Mittel 4-5 Schlaufen weniger (Tab. 25-D; Abb. 49-D). Die Hey2 überexprimierenden Zellen und den HUVEC^{Nb-KD} Zellen, HUVEC^{NbL-KD} Zellen und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen bildeten im Mittel 9-12 Schlaufen weniger aus (Tab. 25-D; Abb. 49-D).

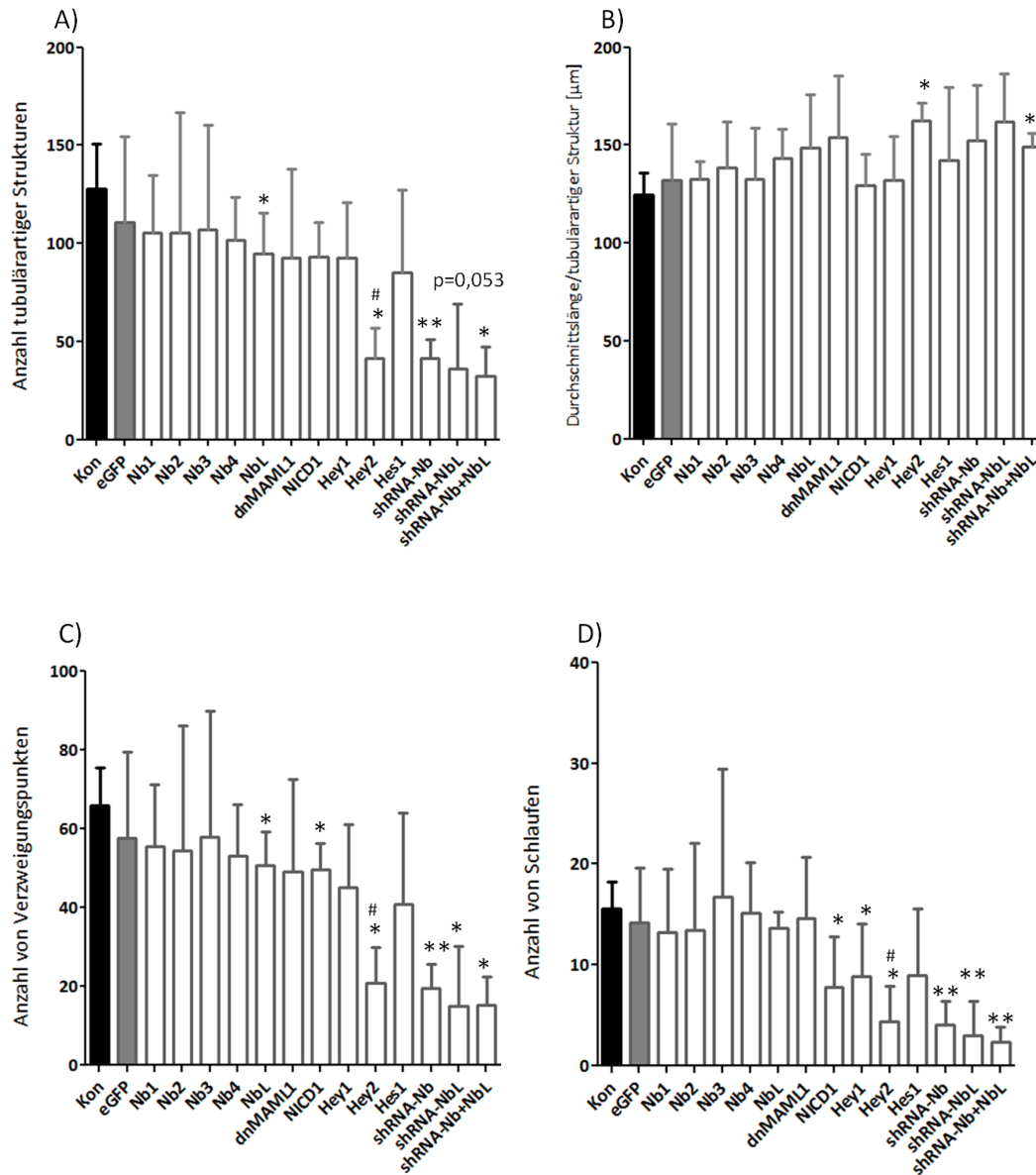


Abb. 49: Bildung tubulärer Verzweigungen in vitro.

Ausgewertet wurde die Anzahl an tubulären Strukturen pro Bildausschnitt (=1790,5 μm x 1341,6 μm) **(A)** und deren durchschnittliche Länge in μm **(B)** als auch die Anzahl an gebildeten Verzweigungspunkten **(C)** und Schlaufen **(D)**. $p \leq 0,05$ wurden mit * bzw. #, $p \leq 0,005$ mit ** markiert; * = gegen die unbehandelte Kontrolle, # = gegen die eGFP-Leerkontrolle (p -Werte wurden über den Students T-test [beidseitig, gepaart für unabhängige Versuche] ermittelt).

Tab. 25: Matrigel.

Anzahl an tubulärartigen Strukturen **(A)**, deren durchschnittliche Längen in μm **(B)** und die Anzahl an gebildeten Verzweigungspunkten **(C)** und Schlaufen **(D)** pro Bildausschnitt (=1790,5 μm x 1341,6 μm). Mittelwert=MW, Standardabweichung=STABW

A)							
tubulärartige Strukt.	HUVEC 1	HUVEC 2	HUVEC 3	HUVEC 4	HUVEC 5	MW	STABW
Kontrolle	126,00	133,00	92,00	156,00	132,00	127,80	23,05
eGFP	114,00	65,00	75,00	174,00	-	107,00	49,42
Numb1	128,00	60,00	97,00	108,00	134,00	105,40	29,44
Numb2	114,00	47,00	50,00	117,00	198,00	105,20	61,77
Numb3	155,00	50,00	75,00	82,00	172,00	106,80	53,45
Numb4	120,00	92,00	86,00	80,00	130,00	101,60	22,06
NbL	98,00	80,00	71,00	100,00	125,00	94,80	20,83
dnMAML1	144,00	42,00	65,00	76,00	137,00	92,80	45,31
NICD1	110,00	-	103,00	98,00	90,00	100,25	8,42
Hey1	113,00	77,00	103,00	51,00	119,00	92,60	28,26
Hey2	60,00	25,00	27,00	41,00	54,00	41,40	15,66
Hes1	110,00	70,00	99,00	127,00	19,00	85,00	42,33
shRNA-Nb	53,00	45,00	35,00	33,00	-	41,50	9,29
shRNA-NbL	51,00	10,00	76,00	8,00	-	36,25	33,09
shRNA-Nb+NbL	-	17,00	33,00	47,00	-	32,33	15,01
B)							
Länge [μm]	HUVEC 1	HUVEC 2	HUVEC 3	HUVEC 4	HUVEC 5	MW	STABW
Kontrolle	162,54	171,57	118,68	201,24	170,28	164,86	29,73
eGFP	147,06	83,85	96,75	224,46	-	138,03	63,75
Numb1	165,12	77,40	125,13	139,32	172,86	135,97	37,98
Numb2	147,06	60,63	64,50	150,93	255,42	135,71	79,69
Numb3	199,95	64,50	96,75	105,78	221,88	137,77	68,95
Numb4	154,80	118,68	110,94	103,20	167,70	131,06	28,46
NbL	126,42	103,20	91,59	129,00	161,25	122,29	26,86
dnMAML1	185,76	54,18	83,85	98,04	176,73	119,71	58,45
NICD1	141,90	-	132,87	126,42	116,10	129,32	10,86
Hey1	145,77	99,33	132,87	65,79	153,51	119,45	36,46
Hey2	77,40	32,25	34,83	52,89	69,66	53,41	20,20
Hes1	141,90	90,30	127,71	163,83	24,51	109,65	54,60
shRNA-Nb	131,58	125,13	179,31	174,15	-	152,54	28,13
shRNA-NbL	154,80	184,47	131,58	178,02	-	162,22	24,07
shRNA-Nb+NbL	-	141,90	149,64	156,09	-	149,21	7,10
C)							
Verzweigungspkt.	HUVEC 1	HUVEC 2	HUVEC 3	HUVEC 4	HUVEC 5	MW	STABW
Kontrolle	66,00	68,00	50,00	75,00	71,00	66,00	9,57
eGFP	62,00	34,00	39,00	88,00	-	55,75	24,72
Numb1	68,00	30,00	52,00	58,00	69,00	55,40	15,87
Numb2	63,00	24,00	24,00	61,00	100,00	54,40	31,80
Numb3	87,00	25,00	39,00	41,00	97,00	57,80	32,02
Numb4	65,00	49,00	46,00	37,00	68,00	53,00	13,13
NbL	51,00	46,00	40,00	53,00	63,00	50,60	8,56
dnMAML1	74,00	23,00	36,00	39,00	74,00	49,20	23,42
NICD1	57,00	-	52,00	52,00	48,00	52,25	3,69
Hey1	56,00	33,00	52,00	24,00	61,00	45,20	15,90
Hey2	32,00	12,00	12,00	20,00	28,00	20,80	9,12
Hes1	47,00	34,00	51,00	67,00	5,00	40,80	23,22
shRNA-Nb	28,00	19,00	18,00	13,00	-	19,50	6,24
shRNA-NbL	26,00	3,00	30,00	1,00	-	15,00	15,12
shRNA-Nb+NbL	-	22,00	8,00	16,00	-	15,33	7,02
D)							
Schlaufen	HUVEC 1	HUVEC 2	HUVEC 3	HUVEC 4	HUVEC 5	MW	STABW
Kontrolle	15,00	15,00	13,00	15,00	20,00	15,60	2,61
eGFP	16,00	9,00	8,00	20,00	-	13,25	5,74
Numb1	17,00	3,00	12,00	15,00	19,00	13,20	6,26
Numb2	19,00	4,00	4,00	18,00	22,00	13,40	8,71
Numb3	28,00	3,00	9,00	12,00	32,00	16,80	12,56
Numb4	20,00	15,00	16,00	7,00	18,00	15,20	4,97
NbL	13,00	15,00	14,00	11,00	15,00	13,60	1,67
dnMAML1	20,00	8,00	13,00	10,00	22,00	14,60	6,15
NICD1	16,00	-	7,00	9,00	5,00	9,25	4,79
Hey1	11,00	5,00	7,00	4,00	17,00	8,80	5,31
Hey2	8,00	1,00	1,00	4,00	8,00	4,40	3,51
Hes1	10,00	6,00	11,00	18,00	0,00	9,00	6,63
shRNA-Nb	6,00	1,00	6,00	3,00	-	4,00	2,45
shRNA-NbL	8,00	1,00	2,00	1,00	-	3,00	3,37
shRNA-Nb+NbL	-	1,00	2,00	4,00	-	2,33	1,53

Die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen prägten im Vergleich zu den Kontrollzellen *in vitro* weniger stark tubulärartige Verzweigungen aus, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs die angiogene Aktivität reduziert. Eine noch stärkere Reduktion der angiogenen Aktivität wiesen die HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen auf. Die Nb überexprimierenden Zellen zeigten im Mittel keine reduzierte oder erhöhte angiogene Aktivität *in vitro* auf. Die NbL überexprimierenden und dnMAML1 exprimierenden Zellen bildeten weniger tubulärartige Strukturen und Verzweigungspunkte, nicht aber weniger Schleifen aus.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität des Notch-Signalwegs Einfluss auf die angiogene Aktivität von HUVECs ausübt. Ebenfalls scheint die Expression von Nb und NbL wichtig für die Bildung von tubulärartigen Strukturen und Verzweigungspunkten und auch für die Ausbildung von Schleifen zu sein.

4. Diskussion

Somatische Stammzellen konnten in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden und erhalten den Organismus durch die Neubildung von Zellen, die durch traumatische, krankheits- oder alterungsbedingte Ereignisse verloren gegangen sind. Die Entwicklung somatischer Stammzellen zu differenzierten Zellen erfolgt hierarchisch, indem ihr Entwicklungspotential schrittweise eingeschränkt wird. Zielsetzung dieser Arbeit war es, Oberflächenmarker zu identifizieren, die eine postulierte Hierarchie in endothelialen Vorläuferzellen beschreiben. Anschließend sollten Einflüsse des Notch-Signalwegs auf die ermittelte hierarchische Entwicklung analysiert werden.

4.1 Hierarchische Entwicklung endothelialer Vorläuferzellen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) sowie humane umbilikale Venenendothelzellen (HUVECs) allem Anschein nach hierarchisch organisiert sind (Ingram et al., 2005; Ingram et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die mittlere Verdopplungsrate endothelialer Vorläuferzellen kontinuierlich mit der Passagendauer einhergehend abnahm, was darauf hindeutet, dass sich der Anteil der teilungsfähigen Zellen von Passage zu Passage verringerte. Die Kultivierung der endothelialen Vorläuferzellen bewirkte dabei eine Ausdünnung der Zellen mit einem geringen Proliferationspotential, so dass sich die Zellkultur zunehmend aus den Nachkommen der Zellen zusammensetzt, die von Beginn an ein höheres Proliferationspotential besaßen. Demzufolge bestanden die ECFC-Linien aus einem heterogenen Zellgemisch primitiver (stark proliferierender) und reifer (weniger stark proliferierender) Zellen.

Einhergehend mit der einsetzenden Differenzierung der Zellen wurde eine Vergrößerung der Zellen und ein erhöhter Anteil von Zellen mit mehreren Kernen beobachtet. Da wir mehrkernige Zellen in den Populationen frisch isolierter HUVECs nachweisen konnten und *in vivo* bereits mehrkernige Endothelzellen in der Hornhaut des Auges beschrieben wurden (Xie et al., 1998), gehen wir davon aus, dass diese

Zellen *in vivo* vorkommen und sich nicht durch die Kulturbedingungen artifiziell entwickelt haben.

4.1.1 Anwendung einer antikörperbasierenden Strategie zur Beschreibung der Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die hierarchische Entwicklung der ECFCs durch eine heterogene Verteilung von Oberflächenmarkern innerhalb der Population darstellbar ist.

In Vorarbeiten wurde innerhalb bestehender ECFC-Populationen das Oberflächenantigen CD34 als heterogen exprimierter Oberflächenmarker beschrieben. Da ECFCs bis zum heutigen Zeitpunkt unzureichend beschrieben wurden, wurde um weitere heterogen verteilte Oberflächenmarker zu identifizieren, die Expression von 106 Oberflächenantigenen mit der Expression von CD34 innerhalb der ECFC-Populationen verglichen. Hierfür wurden Fitc- und PE-konjugierte Antikörper, mit denen in Vorarbeiten hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen charakterisiert wurden (Beckmann et al., 2007), verwendet. 77 der getesteten Oberflächenantigene waren nicht auf Endothelzellen exprimiert (siehe Tab. 7).

Die restlichen 29 auf ECFCs exprimierten Oberflächenproteine ließen sich aufgrund ihres Expressionsmusters in Bezug auf CD34 in 3 Kategorien einteilen: Oberflächenproteine, welche sowohl auf den CD34 positiven ($CD34^{+}$) und CD34 negativen ($CD34^{-}$) ECFCs gleichermaßen exprimiert wurden (Kategorie 1= homogene Expression; Tab. 7) und Oberflächenproteine, welche sich in ihrer Expression innerhalb der $CD34^{+}$ und $CD34^{-}$ Zellfraktion unterschieden (Kategorie 2 und 3= heterogene Expression; Tab. 7). Zur Beschreibung unterschiedlicher Zellidentitäten eigneten sich diesbezüglich die heterogen exprimierten Oberflächenantigene (CD13, CD31, CD40, CD44, CD54, CD63, CD102, CD123, CD146, CD151, CD166, CD252 und VEGF-R2). Zur Kategorie 2 gehörten Oberflächenantigene, die auf den $CD34^{+}$ Zellen stärker exprimiert waren, als auf den $CD34^{-dim}$ Zellen (CD13, CD31, CD40, CD54, CD63, CD102, CD123 und der VEGF-R2). Oberflächenantigene, deren höchste Expression auf den $CD34^{-}$ Zellen nachgewiesen wurde, gehörten zur Kategorie 3 (CD44, CD146, CD151, CD166, CD252).

Funktionell werden die der Kategorie 2 zugeteilten Oberflächenantigene mit Endozytose und Signalkaskaden assoziiert, wohingegen die der dritten Kategorie zugeordneten Oberflächenproteine hauptsächlich Adhäsionsmoleküle darstellen.

Bei inflammatorischen Prozessen werden Endothelzellen aktiviert und fungieren proinflammatorisch, was zu einer veränderten Expression von Oberflächenproteinen der Zellen führt (Almenar-Queralt et al., 1995; Carlos et al., 1990; Chiu et al., 2004; Henninger et al., 1997; Horgan et al., 1991; Kameda et al., 1997; Muro and Muzykantov, 2005; Remy et al., 1999; Sadeghi et al., 2004). Erst nachdem gezeigt wurde, dass die heterogene Verteilung der Oberflächenexpression dieser 14 Oberflächenantigene nicht aufgrund eines Aktivierungszustandes der Zellen herrührte (Abschnitt 3.3.1), wurden diese 14 Marker als Kandidaten zur Beschreibung einer hierarchischen Entwicklung verwendet. Im weiteren Verlauf stellten sich die Oberflächenantigene CD34 und CD44 als die geeignetsten Kandidaten zur Beschreibung der Hierarchie heraus, da durch sie die stärkste Auftrennung verschiedener ECFC-Populationen gelang.

4.1.2 Beschreibung der hierarchischen Entwicklung von ECFCs mit Hilfe von CD34 und CD44

Es wurde beschrieben, dass differenzierte Zellen, im Vergleich zu Stammzellen, die sich hauptsächlich in einem ruhenden Zustand befinden, postmitotisch sind (Furukawa, 1997; Li and Bhatia, 2011). Im Gegensatz dazu weisen primitive Vorläuferzellen ein starkes Proliferationspotential auf (Ingram et al., 2005; LI, 2001; McNiece et al., 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten endotheliale Vorläuferzellen einer Passage im Wesentlichen in die drei Zellpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ unterteilt werden. Hierbei wiesen etwa die Hälfte der Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion nach Einzelzellablage ein koloniebildendes Potential auf. Im Mittel gingen aus dieser Zellfraktion die größten gebildeten Kolonien hervor. Die Zellfraktionen $CD44^{++}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{-}$ bildeten tubulärartige Strukturen im Matrigel, wohingegen die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion keine vergleichbaren Strukturen ausbildeten. Aus Zellen einer ursprünglichen $CD44^{++}CD34^{-}$ ECFC-Linie entwickelten sich im Verlauf

der Kultur, unter Abnahme des Anteils an $CD44^{++}$ Zellen, kontinuierlich $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen. Im Gegensatz hierzu bildeten unter den gewählten Bedingungen weniger als jede zweite Zelle der $CD44^{+}CD34^{-}$ Zellfraktion und nur jede achte $CD44^{+}CD34^{+}$ Zelle nach Einzelzellablage Kolonien aus. Dies lässt vermuten, dass die $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion die primitivsten und die $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion die reifsten Zellen beinhalten.

Einhergehend mit dem geringen Proliferationspotential der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen, befand sich in der $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktion ein erhöhter Anteil an mehrkernigen ECFCs. Mittels Zeitrafferaufnahmen (Daten nicht gezeigt), in denen wir uns Mitosen von $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellen anschauten, fanden wir Zellen, die durch fehlende Zytokinese nach abgeschlossener Kernteilung als mehrkernige Endothelzellen vorlagen. Mehrkernige Zellen sind bereits in anderen differenzierten Zellsystemen wie den Skelettmuskelzellen und den Osteoklasten beschrieben worden. Mehrkernige Skelettmuskelzellen und Osteoklasten entstehen durch Verschmelzung von mononukleären Zellen (Synzytium) (Abmayr and Pavlath, 2012). Des Weiteren sind Hepatozyten und Megakaryozyten mehrkernige Zellen, die durch Endomitosen, in denen eine Verdoppelung der Chromatiden ohne darauffolgende Karyokinese und Zytokinese erfolgt, entstehen (Erenpreisa et al., 2005; Long, 1995).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass $CD34^{+}$ Zellen unter den verwendeten Kulturbedingungen ein geringes Koloniebildungspotential, ein geringes Proliferationspotential und einen erhöhten Anteil an mehrkernigen Zellen aufweisen, weshalb $CD34$ als Marker reifer Endothelzellen angesehen wird. Des Weiteren exprimieren die Intima auskleidenden differenzierten Endothelzellen humaner Nabelschnüre $CD34$. Ebenso exprimieren differenzierte Endothelzellen der humanen inneren thorakalen Aorta (*human internal thoracic artery/HITA*) $CD34$, jedoch nicht, die in dieser Arbeit gefundenen, primitiven endothelialen Vorläuferzellen, die in der Gefäßwand sitzen und als Reservoir der postnatalen Vaskulogenese gelten (Zengin et al., 2006). Aufgrund dieser Daten wurde $CD34$ als Differenzierungsmarker identifiziert. Dagegen spricht die Beobachtung, dass frisch isolierte HUVECs $CD34$ exprimierten und dieses in Kultur innerhalb weniger Passagen herunterregulierten.

Zellen der $CD44^+CD34^-$ Zellfraktion wiesen eine Umwandlungsfähigkeit zu $CD44^{++}CD34^-$ Zellen und umgekehrt auf. Wie bereits beschrieben, bildeten jedoch ECFCs der $CD44^{++}CD34^-$ Zellfraktion statistisch signifikant mehr Kolonien aus, als ECFCs der $CD44^+CD34^-$ und $CD44^+CD34^+$ Zellfraktion. Ebenfalls wiesen die Zellen der drei Zellfraktionen Unterschiede in ihrer biologischen Funktion auf. Da der größte Anteil an kleinen und großen Kolonien in der Zellfraktion der $CD44^{++}CD34^-$ abgelegten Zellen zu finden war, lässt annehmen, dass sowohl Zellen mit einem geringen, als auch die Zellen mit dem höchsten Proliferationspotential in dieser Population vorhanden sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass die $CD44^{++}CD34^-$ Zellfraktion ein heterogenes Zellgemisch darstellt und aus primitiveren und reiferen Zellen besteht. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Möglichkeit offen, ob sich in der $CD44^{++}CD34^-$ Zellfraktion -neben einer Subpopulation primitiver ECFCs- eine Subpopulation von ECFCs befindet, die für die Umwandlung von $CD44^{++}CD34^-$ zu $CD44^+CD34^-$ und umgekehrt verantwortlich ist.

Zur Unterscheidung dieser Zellen innerhalb der $CD44^{++}CD34^-$ Zellfraktion könnten weitere Oberflächenmarker dienen (Abb. 50). Da wir in den bisherigen Untersuchungen keinen entsprechenden Marker gefunden haben, werden in naher Zukunft Genexpressionsanalysen durchgeführt. Mit Hilfe dieser hoffen wir spezifisch exprimierte Gene innerhalb dieser beiden $CD44^{++}CD34^-$ Subpopulationen zu identifizieren, die zu einer Expression auf Proteinebene führen und somit eine detailliertere durchflusszytometrische Separation erlauben. Aufgrund der aktuellen Markerkombination von $CD44^{++}CD34^-$ würden beide Subpopulationen und somit beide Oberflächenproteine isoliert werden, weshalb der Vergleich der Expression der Oberflächenantigene zwischen der $CD44^{++}CD34^-$ und $CD44^+CD34^-$ Zellfraktionen stattfinden wird.

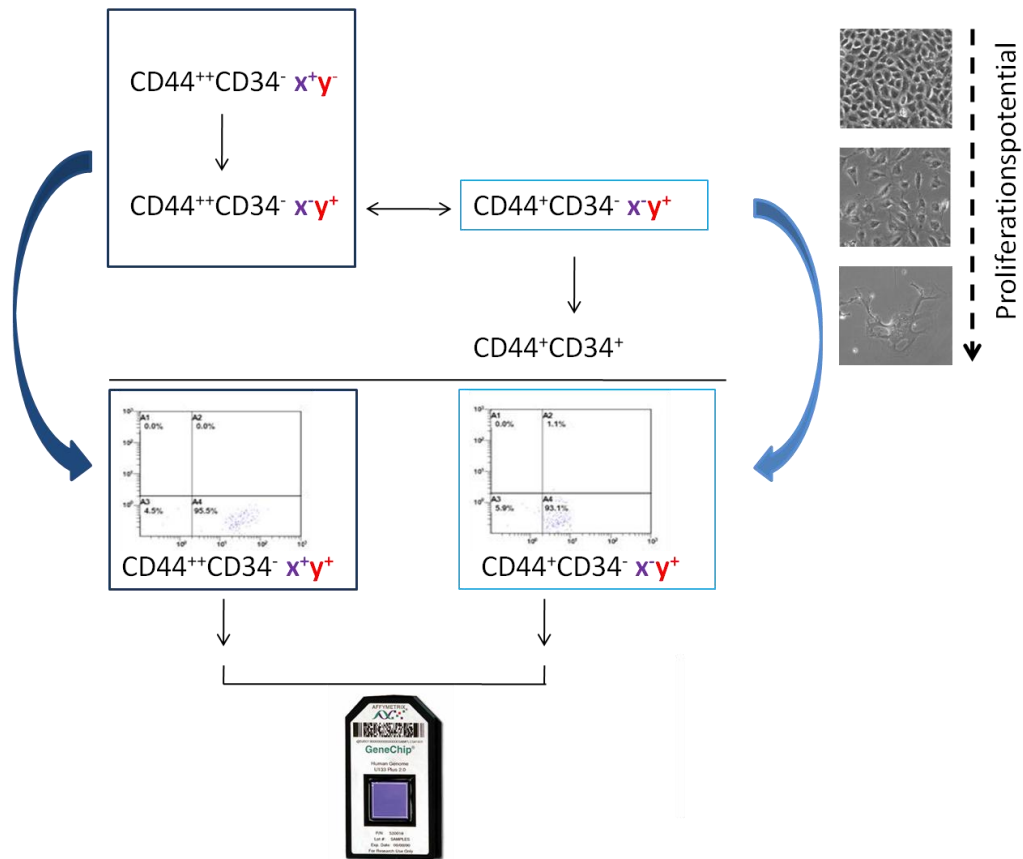


Abb. 50 : Identifikation weiterer Marker zur Diskriminierung der beiden Subpopulationen innerhalb der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion. Durch die Expression eines Markers (x⁺) auf den primitiven Zellen der CD44⁺CD34⁻ Zellfraktion, welcher nicht auf den reiferen CD44⁺CD34⁻ Zellen exprimiert wird (x⁻), sollen die in CD44⁺CD34⁻ umwandelbaren Zellen von den primitiven diskriminiert werden. Ebenfalls würde ein spezifisch exprimierter Marker auf den reiferen CD44⁺CD34⁻ Zellen (y⁺), der nicht auf den primitiveren CD44⁺CD34⁻ Zellen exprimiert wird (y⁻), zu solch einer Diskriminierung führen. Aufgrund der aktuellen Markerkombination CD44⁺CD34⁻ würden jedoch beide Subpopulationen und somit beide Oberflächenproteine isoliert werden (x⁺y⁺), weshalb der Vergleich der Expression der Oberflächenantigene zwischen der CD44⁺CD34⁻(x⁺y⁺) und CD44⁺CD34⁻(x⁻y⁺) Zellfraktionen stattfindet.

Nach unseren Ergebnissen war die antikörperbasierte Strategie zur Identifizierung von Markern zur Beschreibung der hierarchischen Entwicklung von endothelialen Vorläuferzellen erfolgreich. ECFCs und HUVECs unterschiedlicher hierarchischer Entwicklungsstufen können mit der Hilfe von CD34 und CD44 dargestellt werden.

4.1.3 CD34 und CD44 als Stammzellsurrogatmarker in anderen Zellsystemen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD34 und CD44 als hierarchische Marker im endothelialen System qualifiziert. Die Glykoproteine CD34 und CD44 werden bereits in anderen Stammzellsystemen als Surrogatmarker verwendet. So gilt das Oberflächenprotein CD34, wie bereits in der Einleitung unter Punkt 1.2 erläutert, als Marker hämatopoetischer Progenitorzellen und wird zur Charakterisierung von primitiven hämatopoetischen stammzellerhaltenden Zellfraktionen verwendet (Andrews et al., 1986; Civin et al., 1984; Katz et al., 1985).

Zusammen mit CD24 bei Brusttumoren (Al-Hajj et al., 2003) und Pankreastumoren (Li et al., 2007), mit CD166 und EPCAM bei Kolonkarzinomen (Dalerba et al., 2007) und mit CD49b und CD133 bei Prostata Tumoren (Collins et al., 2005) wurde CD44 in den letzten 10 Jahren als Surrogatmarker für Tumorstammzellen in soliden Tumoren etabliert. Hierbei befinden sich in allen aufgezählten soliden Tumoren die Tumorstammzellen in der CD44⁺ Zellfraktion.

Mit den anfangs beschriebenen antikörperbasierenden Analysen (siehe Punkt 4.1) wurde die Expression der oben genannten Oberflächenproteine CD24, CD49b, CD133, CD166 und EPCAM auf endothelialen Vorläuferzellen untersucht. Die Konzentration an CD166 auf der Zelloberfläche variierte und wurde am höchsten auf den Zellen der CD34⁻ Zellfraktion exprimiert. Da CD44, ebenfalls auf den Zellen der CD34⁻ Zellfraktion exprimiert, einen höheren Kontrast als CD166 aufwies, wurde dieser für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Die Expression von CD24, CD133 und EPCAM konnte nicht auf der Zelloberfläche von ECFCs und HUVECs nachgewiesen werden. Das Oberflächenprotein CD49b wies keine heterogene Verteilung innerhalb der Population auf. Diese, die Oberflächenmarker erkennenden Antikörper, waren deshalb nach unseren Ergebnissen nicht dazu geeignet, die Hierarchie im endothelialen System zu beschreiben.

4.1.4 Hierarchie versus Seneszenz

Ausgehend von einer hierarchischen Entwicklung endothelialer Vorläuferzellen, liegt die begrenzte Teilungsfähigkeit der Zellen in ihrer Differenzierung begründet. In anderen Studien wird angenommen, dass die begrenzte Teilungsfähigkeit *in vitro* kultivierter Zellen aufgrund von Seneszenz herrührt (Hayflick and Moorhead, 1961). Nach der Definition von Hayflick arretieren seneszente Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, bleiben metabolisch aktiv und können durch mitogene Stimuli nicht mehr in den Zellzyklus eintreten (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961).

Da wir Seneszenz nicht als Ursache unserer Beobachtungen ansehen, wurde von einem Nachweis Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase-Aktivität aus Gründen anderer Prioritäten abgesehen (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961). Des Weiteren wird der Nachweis seneszenten Zellen über β -Galaktosidase-Aktivität kontrovers diskutiert, da Untersuchungen in *in vivo* und *in vitro* dafür sprechen, dass eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase auch unabhängig von der replikativen Seneszenz auftreten kann (Going et al., 2002; Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006).

Der Nachweis, dass CD34 auf den Intima auskleidenden HUVECs humaner Nabelschnüre exprimiert wird, verstärkt die Annahme, dass CD34 einen Differenzierungsmarker für Endothelzellen darstellt und nicht den Prozess der Seneszenz beschreibt. Ebenfalls wurde (wie bereits erwähnt) CD34 *in vivo* auf differenzierten Endothelzellen nachgewiesen, jedoch nicht auf den in der Gefäßwand sitzenden, primitiven endothelialen Vorläuferzellen (Zengin et al., 2006).

4.2 Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen

Der Notch-Signalweg spielt in einer Reihe von Prozessen eine Rolle bei der Proliferation und der Entscheidung Selbsterneuerung versus Differenzierung somatischer Stammzellen (Bigas and Espinosa, 2012; Chiba, 2006).

Allein für die Hämatopoese wurde gezeigt, dass der Notch-Signalweg sowohl eine Rolle in der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen spielt als auch bei dem Erhalt dieser. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs führt primär zu der Entwicklung

von Zellen der lymphoiden Linie, insbesondere zur Differenzierung von T-Zellen; wohingegen das Fehlen des Notch-Signals zur Determinierung des B-Zellschicksals führt (Besseyrias et al., 2007; Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999). Des Weiteren wurde sowohl im adulten humanen hämatopoetischen System als auch für das hämatopoetische System der Maus gezeigt, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs die Expansion und die Selbsterneuerung HSZ/HVZ vermittelt (Dando et al., 2005; Karanu et al., 2001; Karanu et al., 2003).

Auch für Endothelzellen wurde berichtet, dass der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Aussprossung neuer Blutgefäße (Angiogenese) spielt (siehe auch Abschnitt 4.2.1). Um den Prozess der Gefäßaussprossung zu initiieren, werden proliferierende Endothelzellen benötigt. Darüber hinaus sind differenzierte Endothelzellen für die Remodellierung der Gefäße erforderlich. Der Notch-Signalweg ist dafür bekannt, dass er durch zeitweilige Aktivität an der Remodellierung neu gebildeter Gefäße beteiligt ist (Herbert and Stainier, 2011). Hierbei konnten *in vivo* Studien zeigen, dass der Notch-Signalweg während den frühen Stadien der Angiogenese inaktiv ist (wenn eine starke Proliferation von Endothelzellen notwendig ist), jedoch während der Gefäßreifung in späteren Stadien aktiviert wird (wenn das Proliferationspotential der Endothelzellen nachlässt) (Henderson et al., 2001; Taylor et al., 2002).

Darauf aufbauend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der Notch-Signalweg die Differenzierung von HUVECs fördert. Nach Expression von NICD1 und Überexpression von Hey1, Hey2 und Hes1 wiesen HUVECs ein erniedrigtes Koloniebildungs- und Proliferationspotential auf sowie diese Zellen eine erhöhte Expression des -in dieser Arbeit als Differenzierungsmarker angesehenen- Oberflächenproteins CD34 aufwiesen. Des Weiteren unterlagen diese Zellen den Kontrollzellen gegenüber einem selektiven Wachstumsnachteil. Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs die Differenzierung von Endothelzellen induziert.

In Analogie dazu wiesen HUVECs nach Inhibierung des Notch-Signalwegs durch die Expression von dnMAML1 eine erhöhte Koloniebildungsrate sowie eine leicht

verringerte Expression des Differenzierungsmarkers CD34 auf. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass dnMAML1 durch Inhibierung des Notch-Signalwegs die Differenzierung der Zellen heraus zögerte.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass sich HUVECs nach Überexpression von Numb und Numblike häufiger und nach Herunterregulation der Expression von Numb (HUVEC^{Nb-KD}) oder Numblike (HUVEC^{NbL-KD}) weniger im Vergleich zu den Kontrollzellen teilten. Die geringste Anzahl an Zellteilungen wiesen HUVECs auf, in denen Numb und Numblike parallel herunterreguliert wurden (HUVEC^{Nb+NbL-KD}). Diese Zellen unterlagen einem stärkeren selektiven Wachstumsnachteil als HUVEC^{Nb-KD} Zellen und HUVEC^{NbL-KD} Zellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Numb und Numblike funktionell redundant wirken. In anderen Zellsystemen wurde bereits gezeigt, dass Numb und Numblike funktionell redundant wirken. Beispielsweise spielen Numb und Numblike eine redundante Rolle beim Erhalt neuraler Vorläuferzellen während der Embryogenese der Maus (Petersen et al., 2002) und bei der Differenzierung erythroider Vorläuferzellen während der Hämatopoese im Zebrafisch (Bresciani et al., 2010).

Numblike überexprimierende Zellen zeigten eine erniedrigte Expression des Differenzierungsmarkers CD34, wohingegen Nb überexprimierende Zellen keine veränderte Oberflächenexpression für CD34 aufwiesen. Weiterhin sank nach Überexpression von Numblike der Gehalt der Notch-Zielgene Hey1 und Hes1, was auf einen modulativen Einfluss von Numblike auf den Notch-Signalweg hindeuten könnte. Dass Numblike den Notch-Signalweg inhibieren kann, wurde bereits in einer embryonalen Stammzelllinie der Maus und HEK-293T Zellen beschrieben (Liu et al., 2011). Im Vergleich dazu führte eine Herunterregulation von Numblike zu keinem veränderten Gehalt an Hey1- und Hes1-RNA.

Bei den Numb überexprimierenden Zellen exprimierten im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhter Anteil der Zellen CD44⁺⁺. Der Anteil an CD44⁺⁺ exprimierenden Zellen war hingegen bei den dnMAML1 exprimierenden und den Numblike überexprimierenden Zellen nicht verändert. Im Gegensatz hierzu bewirkte eine direkte Inhibierung des Notch-Signalwegs über dnMAML1, neben einer erwarteten Reduktion der

NICD1-Zielgene Hey1 und Hes1, eine leicht erhöhte Expression von Numblike -jedoch nicht von Numb- auf RNA-Ebene.

Diese und die zuvor beschriebenen Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Numb und Numblike durch unterschiedliche Mechanismen auf den Notch-Signalweg wirken. Dass Numb und Numblike trotz ihrer starken Homologie über verschiedene Mechanismen agieren, konnte an verschiedenen Beispielen gezeigt werden:

Colaluca *et al.* verglichen in Brustepithelzellen die Rolle von Numb und Numblike und berichteten, dass Numb regulatorisch auf das Tumorsuppressorprotein p53 wirkt, indem es mit dem p53-inaktivierenden Komplex p53/MDM2 interagiert und somit die Ubiquitinierung und Degradation von p53 verhindert (Colaluca et al., 2008). Numblike bildet keinen Komplex mit p53 und MDM2 und verhindert nicht die Ubiquitinierung und Degradation von p53 (Colaluca et al., 2008). Auf diese Arbeit aufbauend verglichen Liu *et al.* die Interaktion von Numb und Numblike mit p53 in HEK293T-Zellen. Diese Studien zeigen ebenfalls, dass, im Gegensatz zu Numb, Numblike keinen Komplex mit p53 und MDM2 bildet und nicht die Ubiquitinierung und Degradation von p53 verhindert (Liu et al., 2011).

Im Hinblick auf den Sonic Hedgehog (Shh) Signalweg wirken Numb und Numblike in HEK293T-Zellen entgegengesetzt: während Numb das Zielgen Gli von Shh durch vermittelte Ubiquitinierung runterreguliert, wird dieses durch Numblike hochreguliert (Liu et al., 2011).

Diese unterschiedlichen Effekte von Numb und Numblike auf den p53- und Shh- Signalweg weisen auf eine funktionelle Vielfalt von Numb und Numblike hin. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass die 4 humanen Isoformen von Numb unterschiedliche regulatorische Effekte auf die Differenzierung und Proliferation von neuronalen Zellen im Säugersystem bewirken (Verdi et al., 1996). In dieser Studie wird berichtet, dass in neuronalen Zellen die Numb-Isoformen mit einer kurzen PRR-Domäne (Numb2 und Numb4) zur Differenzierung der Zellen führen, wohingegen die Numb-Isoformen mit einer langen PRR-Domäne (Numb1 und Numb3) die Proliferation der neuralen Zellen induzieren.

In dieser Arbeit führte eine Überexpression aller 4 Numb-Isoformen zu einem erhöhten Koloniebildungs- und Proliferationspotential in endothelialen Vorläuferzellen und zu einem erhöhten Anteil der CD44⁺⁺ Zellfraktion. Dies lässt annehmen, dass sowohl die Numb-Isoformen mit einer langen PRR-Domäne als auch die mit einer kurzen PRR-Domäne eine Rolle beim Erhalt der Primitivität humaner endothelialer Vorläuferzellen spielen.

4.2.1 Einfluss des Notch-Signalwegs auf das angiogene Potential endothelialer Vorläuferzellen

Gefäßsysteme bestehen aus den gefäßbildenden *Stalk*-Zellen; Verzweigungen innerhalb des Gefäßsystems werden von *Tip*-Zellen induziert (Gerhardt et al., 2003; Gerhardt et al., 2004). Hierbei ist Notch1 an der Entscheidung *Tip*- vs. *Stalk*-Zelle beteiligt (Herbert and Stainier, 2011).

Bereits von anderen Autoren wurde beschrieben, dass eine erhöhte Menge an aktiviertem Notch die Ausbildung von *Tip*-Zellen reduziert und somit den Prozess des Gefäßauswachsens und die Bildung von Verzweigungen inhibiert (Sainson et al., 2005). Das Fehlen des Notch-Signals hingegen bewirkt eine erhöhte Teilung und Bildung der *Tip*-Zellen, wodurch eine verstärkte Gefäßaussprossung und Verzweigung stattfindet (Hellstrom et al., 2007b; Sainson et al., 2005).

Entsprechend dieser Beschreibungen bildeten die NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden HUVECs eine verringerte Anzahl an Verzweigungspunkten innerhalb der gebildeten tubulärartigen Strukturen aus. Parallel wiesen die gebildeten tubulärartigen Strukturen im Vergleich zur Kontrolle im Mittel eine erhöhte Länge auf. Somit führte eine Überexpression aller getesteten Komponenten des Notch-Signalwegs in HUVECs zu einer verringerten Bildung von Verzweigungspunkten, was einer Reduzierung an *Tip*-Zellen entspricht. Die gemessene erhöhte Länge der tubulärartigen Strukturen resultierte aufgrund einer verstärkten Ausbildung an *Stalk*-Zellen.

Vor dem Hintergrund, dass das Fehlen des Notch-Signals eine erhöhte Teilung und Bildung der *Tip*-Zellen bewirkt, woraus eine verstärkte Gefäßaussprossung und

Verzweigung resultiert (Hellstrom et al., 2007b; Sainson et al., 2005), stellte sich die Frage, ob eine Überexpression von Numb zu einer erhöhten Ausbildung von Tip-Zellen, sprich Verzweigungen, führt. Durch eine Überexpression von Numb1-4 und dessen Homolog Numblake wurde keine erhöhte Anzahl an Verzweigungspunkten innerhalb der gebildeten tubulärartigen Verzweigungen festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Ausbildung von Tip-Zellen durch eine durch VEGF-A induzierte Expression von Dll4 induziert wird und nicht durch die alleinige Inhibition des Notch-Signalwegs (Hellstrom et al., 2007a; Hellstrom et al., 2007b; Hofmann and Iruela-Arispe, 2007). Andererseits zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass die Expression von Numb und Numblake eine wichtige Rolle bei der Bildung von tubulärartigen Strukturen spielt, da HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen halb so viele Verzweigungspunkte und tubulärartige Strukturen wie die Kontrollzellen ausbildeten. Des Weiteren bildeten HUVEC^{Nb-KD}, HUVEC^{NbL-KD} und HUVEC^{Nb+NbL-KD} Zellen, ähnlich wie NICD1 exprimierende und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierende Zellen, längere tubulärartige Strukturen aus. Diese Beobachtung geht einher mit der Vermutung, dass Numb und Numblake inhibierend auf den Notch-Signalweg wirken und eine Herunterregulation von Numb und Numblake zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs führt. In Analogie dazu wurde nach Überexpression von Numb und Numblake ein erniedrigter Gehalt an Hey1- und Hes1-RNA als auch nach Herunterregulation von Numb ein erhöhter Gehalt an Hey1- und Hes1-RNA nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde keine veränderte Expression von Hey1- und Hes1-RNA nach Herunterregulation von Numblake festgestellt, was erneut -auf die bereits diskutierten- unterschiedlichen Mechanismen hindeutet.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Numb und Numblake wichtig für die Bildung von tubulärartigen Strukturen sind und sowohl Numb als auch Numblake, wenn auch möglicherweise über unterschiedliche Mechanismen, in HUVECs modulierend auf den Notch-Signalweg wirken.

4.3 Anzucht von ECFCs

Unabhängig von den Untersuchungen der Subpopulationen und den mechanistischen Einflüssen sollen zum Abschluss die auftretenden Schwierigkeiten der ECFC-Anzucht diskutiert werden.

Die zur Anzucht von ECFCs verwendeten Nabelschnurrestblute zeigten eine große Varianz bezüglich des Gehalts an zu ECFCs auswachsenden Zellen. Hierbei konnten im Durchschnitt aus 60 % der Nabelschnurblute erfolgreich ECFCs angezogen werden, wobei jedoch auffiel, dass diese auswachsenden Zellen ein unterschiedliches Expansionspotential besaßen. So wuchsen beispielsweise in einigen Bluten 1 Kolonie an ECFCs und aus anderen Bluten bis zu 8 Kolonien an ECFCs aus. Ebenfalls traten starke Schwankungen bezüglich des Proliferationspotentials der auswachsenden ECFCs auf. Je nach ECFC-Population schwankten die kumulativen Zellteilungen zwischen 5 und über 30, wodurch die Verwendung der jeweiligen ECFCs teils eingeschränkt wurde. Diese Abweichungen können aus einer genetischen Varianz der verschiedenen Spender bzw. aus einer möglicherweise vorausgegangenen Medikation resultieren. Da aus Datenschutzgründen solche Faktoren im Vorfeld nicht erfasst werden können, lassen sich diese Abweichungen nicht verhindern. Ebenso könnten diese Unterschiede im Entwicklungspotential der angezogenen ECFCs aufgrund des Alters der verwendeten Nabelschnurblute, also der Zeit zwischen der Abnahme und der Aufreinigung, die von wenigen Stunden bis zu zwei Tagen reichte, resultieren. Eine dritte Möglichkeit stellt der bereits diskutierte hierarchische Entwicklungszustand der angezogenen ECFCs zum Zeitpunkt der Anzucht dar, aufgrund dessen die Zellen ein unterschiedliches Proliferationspotential aufweisen.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass aus 60 % der in Blutbeuteln der Firma Macopharma International GmbH abgenommenen Blute ECFCs auswuchsen, aber nur aus 3 % der Blute, die in Blutbeuteln der Firma Fresenius Netcare GmbH abgenommen wurden. Der prozentuale Anteil des Weichmachers DEHP (Di-Ethyl-Hexyl-Phthalat), welcher laut Hersteller standardmäßig für die Herstellung von Blutbeuteln verwendet wird, variiert zwischen den beiden Blutbeuteln. Die Zusammensetzung der Beutelfolie der Beutel der Firma Macopharma liegt bei 69 % PVC, 30 % DEHP und unter 1 %

Hilfsstoffe (hauptsächlich Zinkstearat). Die Beutelfolie der Beutel der Firma Fresenius besteht hingegen laut telefonischer Aussage aus einem höheren Anteil des Weichmachers DEHP. Die Industrie arbeitet DEHP in polymere Stoffe ein, da diese dadurch elastischer werden. DEHP geht keine chemische Verbindung ein, wodurch es daher mit der Zeit zum Beispiel aus Kunststoffen wieder entweichen kann. Übereinstimmend hat eine Vielzahl von Studien verdeutlicht, dass der Konsum von DEHP über Lebensmittel negative gesundheitliche Folgen auf Hoden, Leber und Nieren haben kann (Choi et al., 2011; Koch et al., 2006; Pocar et al., 2011) und es als Fruchtbarkeitsschädigend eingestuft wird (Klingmüller and Allera, 2011). Demnach könnte vermutet werden, dass ein höherer Anteil an DEHP bereits im Blutbeutel letal auf die zu ECFCs auswachsenden Zellen wirkt. Dies würde die Vermutung nahe legen, dass DEHP auch einen Vitalitätseinschränkenden Einfluss auf andere Stamm- und Vorläuferzellen ausüben könnte, wodurch eine Umstellung auf DEHP-freie Blutabnahmesysteme zu bedenken wäre.

5. Zusammenfassung

ECFCs stellen eine *in vitro* effizient expandierbare neue endotheliale Zellquelle dar. Die Proliferationseigenschaften und die morphologische Veränderung von ECFCs *in vitro* weist auf eine hierarchische Entwicklung dieser hin. Die verschiedenen hierarchischen Entwicklungsstufen sollten daher durch spezifische Kombinationen von unterschiedlich exprimierten Oberflächenproteinen dargestellt werden.

Das Oberflächenprotein CD34 wird heterogen auf ECFCs exprimiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Antikörper-basiertes Screening gegen 106 Oberflächenantigene durchgeführt, durch das weitere heterogen exprimierte Marker identifiziert werden sollten. Von den 106 untersuchten Oberflächenproteinen werden 29 auf der Zelloberfläche von ECFCs exprimiert, 13 dieser Oberflächenmarker weisen eine heterogene Expression gegen CD34 auf. Die Oberflächenantigene CD13, CD31, CD40, CD54, CD63, CD102, CD123 und VEGF-R2 waren auf den CD34 positiven Zellen stärker exprimiert, als auf den CD34 negativen/schwach positiven Zellen (Gruppe 1). Die höchste Expression der Oberflächenantigene CD44, CD146, CD151, CD166 und CD252 wurde auf den CD34 negativen Zellen nachgewiesen (Gruppe 2). Die stärkste Auftrennung verschiedener ECFC-Linien gelang mit den Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD34 aus der Gruppe 1 und gegen das Oberflächenantigen CD44 aus der Gruppe 2, wobei die drei Subpopulationen $CD44^{++}CD34^{-}$, $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ definiert wurden.

Übereinstimmend mit der Annahme, dass die $CD44^{+}CD34^{+}$ Subpopulation die reiferen Progenitoren beinhaltet, wiesen die Zellen der $CD44^{+}CD34^{+}$ Subpopulation das geringste Expansionspotential auf. Weiterhin wurde der höchste Anteil an mehrkernigen Zellen innerhalb der $CD44^{+}CD34^{+}$ Subpopulation nachgewiesen, ein weiterer Indikator für die Differenzierung dieser Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Möglichkeit offen, ob sich in der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion -neben einer Subpopulation primitiver ECFCs- eine Subpopulation von ECFCs befindet, die für eine Umwandlung von $CD44^{++}CD34^{-}$ zu $CD44^{+}CD34^{-}$ und umgekehrt verantwortlich ist. Zur Untersuchung des klonogenen Potentials der Subfraktionen wurden einzelne Zellen kultiviert und ihre Fähigkeit, Kolonien auszubilden, untersucht. Hierbei besaßen die Zellen der $CD44^{++}CD34^{-}$ Zellfraktion das höchste Koloniebildende Potential und die höchste Zellteilungsrate im Vergleich zu den Zellen der $CD44^{+}CD34^{-}$ und $CD44^{+}CD34^{+}$ Zellfraktionen. Mit der Hilfe von CD34 und CD44 können ECFCs und HUVECs

unterschiedlicher hierarchischer Entwicklungsstufen erfolgreich voneinander unterschieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Komponenten des Notch-Signalwegs Einfluss auf das Zellschicksal endothelialer Vorläuferzellen ausüben. Durch die Verwendung eines lentiviralen Systems wurden Untersuchungen zum Funktionszugewinn und Funktionsverlust entsprechender Mediatoren des Notch-Signalwegs (NICD1, Hey1, Hey2 und Hes1) und der Zellschicksalsdeterminanten Numb und Numblake durchgeführt.

Ein erhöhter Anteil CD34⁺ Zellen wurde in der Zellfraktion der NICD1 exprimierenden und Hey1, Hey2 und Hes1 überexprimierenden Zellen nachgewiesen, wohingegen im Mittel ein erhöhter Anteil an CD44⁺⁺ Zellen innerhalb der Numb und Numblake überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Übereinstimmend mit der Implikation, dass das Oberflächenantigen CD34 hauptsächlich auf reifen Endothelzellen exprimiert wird, wiesen die Notch-aktiven HUVECs im Vergleich zu den Kontrollzellen eine verringerte Koloniebildungs- und Zellteilungsrate auf. Im Gegensatz dazu wurde die höchste Koloniebildungs- und Zellteilungsrate innerhalb der Numb- und Numblake überexprimierenden Zellen gefunden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Mitglieder des Notch-Signalwegs die Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen initiieren, wohingegen Numb und Numblake die Primitivität der Zellen erhält.

6. Summary

ECFCs are a novel entity of endothelial cells, which can be efficiently expanded *in vitro*. Regarding their proliferation rate and morphology, ECFCs seem to be organized in a hierarchical manner. We hypothesize that putative hierarchical levels are reflected by specific combinations of cell surface proteins and define different ECFC subpopulations.

Previously, the cell surface protein CD34 was recognized as a marker that is heterogeneously expressed on ECFCs. In the course of this study we aimed to identify additional markers and performed a cell surface-based antibody screen recognizing 106 different cell surface antigens. Out of those, 29 cell surface proteins were found to be expressed on ECFCs, and 13 of them revealed a heterogeneous expression. Considering the distribution of CD34 expression in relation to each of these 13 marker proteins, two different subgroups of ECFCs were established. While CD34-positive cells revealed the highest expression of members of one group, ECFCs with the strongest expression of members of the other group were found within the CD34-negative cell fraction. Due to the fact that CD34 and CD44 as representatives of both subgroups showed the highest heterogeneous contrast within their groups, we decided to use CD34 and CD44 staining for further analysis, defining the three subpopulations of CD44⁺⁺CD34⁻, CD44⁺CD34⁻ and CD44⁺CD34⁺ cells. The subpopulation of CD44⁺CD34⁺ cells showed the lowest expansion potential and in agreement with our implication that the CD44⁺CD34⁺ population contains mainly mature endothelial cells, they displayed the highest content of polynuclear cells, which is another indication for their maturity. Therefore, we conclude that the CD44⁺CD34⁺ cell fraction consists mainly of mature endothelial cells. Our results displayed that CD44⁺⁺ can convert into CD44⁺ and vice versa. Therefore, we propose that the CD44⁺⁺CD34⁻ fraction contains two subpopulations: a) a more mature subpopulation which is responsible for the conversion of the CD44⁺CD34⁻ fraction and b) a more primitive ECFC cell fraction. Therefore, no obvious relationship between these two subpopulations could be observed within these bulk analyses. The most rigorous test for the clonogenic potential of progenitors is to determine whether a single cell will form a colony in the absence of other cells. At this, the CD44⁺⁺CD34⁻ cells showed the highest colony-forming frequency and in average formed bigger colonies than cells of the CD44⁺CD34⁻ and CD44⁺CD34⁺ cells when seeded as single cells.

We demonstrate that a hierarchy of progenitor cells can be identified in ECFCs derived from umbilical cord blood and discriminated them by their cell surface expression of the cell surface antigens CD34 and CD44.

In the course of this study we also tried to identify factors being involved in controlling self-renewal versus differentiation processes in this hierarchical system. The functional impact of the intrinsic factors of the notch signalling pathway (Notch1^{ICD}, Hey1, Hey2 and Hes1) and of the cell fate determinants Numb and Numbl like were analysed by performing overexpression or mediated knockdown experiments by lentiviral transduction of endothelial progenitor cells. We could demonstrate that on the one hand the highest amount of CD34 positive cells were detected within the Notch1^{ICD}, Hey1, Hey2 and Hes1 lentiviral transduced cell fraction and on the other hand the highest amount of CD44⁺⁺CD34⁻ cells were observed within the Numb lentiviral transduced cell fraction. In agreement with our implication that the cell surface antigen CD34 is mainly expressed on mature endothelial cells, we could demonstrate that the Notch1^{ICD}, Hey1, Hey2 and Hes1 lentiviral transduced cells showed the lowest colony-forming frequency, the lowest cumulative population doublings rate and are subjected selective disadvantage when compared to the control cells. In contrast, the highest colony-forming frequency, the highest cumulative population doublings rate and a selective advantage of Numb and Numbl like lentiviral transduced cells could be observed when compared with the control cells. These results lead to the assumption, that the members of the notch signaling pathway initiates maturation whereas Numb and Numbl like initiates primitiveness of ECFCs.

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem Thema „Identifikation von Zelloberflächenproteinen zur Beschreibung der Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Liska Delia Horsch befürworte.

Essen, den _____

(PD Dr. rer. nat. Bernd Giebel)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

(Liska D. Horsch)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

(Liska D. Horsch)

7.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben und helfend zur Seite standen.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Peter Horn bedanken, der mir die Möglichkeit gab dieses Thema am Institut für Transfusionsmedizin zu bearbeiten und trotz vollem Terminkalender stets ein offenes Ohr für seine Mitarbeiter hat.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Betreuer PD Dr. Bernd Giebel für die Vergabe des interessanten Themas. Durch seine intensive Betreuung konnte ich viele Arbeitstechniken erlernen. Seine beharrliche Diskussionsbereitschaft lehrte mich, Ergebnisse nicht vorschnell zu interpretieren sondern kritisch zu hinterfragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Ärzten, Schwestern und Hebammen der Frauenklinik in Essen, durch die wir sehr zuverlässig mit Nabelschnurblut und Nabelschnüren versorgt wurden. Ebenfalls gilt mein Dank den Ärzten und Schwestern aus der Transfusionsmedizin, durch die wir immer an Thrombozytenkonzentrate gelangten.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes, für die gute Atmosphäre und die kompetente Unterstützung und Hilfe, die sie mir entgegen gebracht haben. Vielen Dank auch an Dr. Diana Klein mit der mir die kleinen Ausflüge in die Welt der Paraffinschnitte immer wieder Spaß bereitet haben. Ebenfalls möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei unserem Kollaborationspartner Dr. Bernd Denecke bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern der AG Giebel: Ich möchte euch allen für eure Hilfsbereitschaft, den Spaß trotz langen harten Arbeitstagen und den Zusammenhalt untereinander danken! Danke dir Anna, für die guten Gespräche, deine belustigenden 'Chaos-Panik-Auftritte' im Labor und die für den nötigen Ausgleich

sorgenden Sportabende. Danke dir Andre, für deine doch manchmal abfärbende beruhigende Art, deine Hilfsbereitschaft und natürlich für die bereitgestellten Konstrukte. Vielen Dank an dich Stefan, meinem Sitzplatzpartner, für deine stetige Hilfsbereitschaft, vor allem wenn der Computer nicht so wollte wie ich und dass du immer für eine volle Schokoschublade gesorgt hast. Danke auch dir Sören, für deine Hilfsbereitschaft und das „mal eben mitmachen einiger Konstrukte“ sowie für all die blöden Kommentare und all die Späße die den Laboralltag leichter gemacht haben. Auch wenn wir nicht allzu viel Zeit gemeinsam im Labor verbracht haben, möchte ich mich auch bei dir Thorsten, für deine Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei den ehemaligen Doktorandinnen Esther Zipperer und Friederike Albrecht für die schöne Zeit im Labor bedanken.

Auf diesem Wege möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie für ihr stetes Interesse und meinen Mädels für ein immer offenes Ohr und die vielen guten Ablenkungen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und der Zeit der Promotion mit Rat und Tat unterstützt haben. Vielen, vielen Dank für euer Interesse, den Beistand und Rückhalt und euerm Verständnis für 'schlechte Laune Phasen'. DANKE

Ein ebenso großer Dank gilt meinem Freund Timur; Danke für die Motivation und Ablenkung, die Unterstützung und Hilfe in heißen Phasen und auch dir vielen Dank für dein Verständnis, wenn ich mal nicht so gut gelaunt war. DANKE

9. Literaturverzeichnis

- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641-656.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.
- Al-Hajj, M. (2007). Cancer stem cells and oncology therapeutics. *Curr Opin Oncol* **19**, 61-64.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988.
- Alison, M.R., Lim, S.M., and Nicholson, L.J. (2011). Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol* **223**, 147-161.
- Almenar-Queralt, A., Duperray, A., Miles, L.A., Felez, J., and Altieri, D.C. (1995). Apical topography and modulation of ICAM-1 expression on activated endothelium. *Am J Pathol* **147**, 1278-1288.
- Andrews, R.G., Bryant, E.M., Bartelmez, S.H., Muirhead, D.Y., Knitter, G.H., Bensinger, W., Strong, D.M., and Bernstein, I.D. (1992). CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* **80**, 1693-1701.
- Andrews, R.G., Singer, J.W., and Bernstein, I.D. (1986). Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* **67**, 842-845.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967.
- Aster, J.C., Pear, W.S., and Blacklow, S.C. (2008). Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* **3**, 587-613.
- Au, P., Daheron, L.M., Duda, D.G., Cohen, K.S., Tyrrell, J.A., Lanning, R.M., Fukumura, D., Scadden, D.T., and Jain, R.K. (2008). Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* **111**, 1302-1305.
- Barone, J.E. (2009). Fever: Fact and fiction. *J Trauma* **67**, 406-409.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2804-2808.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C., and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* **109**, 5494-5501.
- Benedito, R., Trindade, A., Hirashima, M., Henrique, D., da Costa, L.L., Rossant, J., Gill, P.S., and Duarte, A. (2008). Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC Dev Biol* **8**, 117.
- Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J.A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 221-231.
- Besseyrias, V., Fiorini, E., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Dumortier, A., Koch, U., Arcangeli, M.L., Ezine, S., Macdonald, H.R., and Radtke, F. (2007). Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* **204**, 331-343.

- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., and Dick, J.E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4, 1038-1045.
- Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5320-5325.
- Bigas, A., and Espinosa, L. (2012). Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood*.
- Blank, U., Karlsson, G., and Karlsson, S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111, 492-503.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Booyse, F.M., Quarfoot, A.J., Chediak, J., Stemerman, M.B., and Maciag, T. (1981). Characterization and properties of cultured human von Willebrand umbilical vein endothelial cells. *Blood* 58, 788-796.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Bresciani, E., Confalonieri, S., Cermenati, S., Cimbri, S., Foglia, E., Beltrame, M., Di Fiore, P.P., and Cotelli, F. (2010). Zebrafish numb and numblake are involved in primitive erythrocyte differentiation. *PLoS One* 5, e14296.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Bruce, W.R., and Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature* 199, 79-80.
- Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., *et al.* (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 251-264.
- Calvi, L.M. (2006). Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 477-488.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R., and *et al.* (1990). Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 76, 965-970.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.
- Case, J., Mead, L.E., Bessler, W.K., Prater, D., White, H.A., Saadatzaheh, M.R., Bhavsar, J.R., Yoder, M.C., Haneline, L.S., and Ingram, D.A. (2007). Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 35, 1109-1118.
- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One* 3, e2735.
- Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Hague, N., Moore, M., *et al.* (1996). Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* 87, 479-490.
- Chiba, S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24, 2437-2447.
- Chiu, J.J., Lee, P.L., Chen, C.N., Lee, C.I., Chang, S.F., Chen, L.J., Lien, S.C., Ko, Y.C., Usami, S., and Chien, S. (2004). Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin

- expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 73-79.
- Choi, K., Joo, H., Campbell, J.L., Jr., Clewell, R.A., Andersen, M.E., and Clewell, H.J., 3rd (2011). In vitro metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by various tissues and cytochrome P450s of human and rat. *Toxicol In Vitro*.
- Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165.
- Claxton, S., and Fruttiger, M. (2004). Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Expr Patterns* 5, 123-127.
- Colaluca, I.N., Tosoni, D., Nuciforo, P., Senic-Matuglia, F., Galimberti, V., Viale, G., Pece, S., and Di Fiore, P.P. (2008). NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* 451, 76-80.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.
- Congdon, K.L., and Reya, T. (2008). Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Curr Opin Immunol* 20, 302-307.
- Critser, P.J., and Yoder, M.C. (2010). Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 15, 68-72.
- D'Souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27, 5148-5167.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10158-10163.
- Dando, J.S., Tavian, M., Catelain, C., Poirault, S., Bennaceur-Griscelli, A., Sainteny, F., Vainchenker, W., Peault, B., and Lauret, E. (2005). Notch/Delta4 interaction in human embryonic liver CD34+ CD38- cells: positive influence on BFU-E production and LTC-IC potential maintenance. *Stem Cells* 23, 550-560.
- Das, A.T., Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Verhoef, K., Marzio, G., and Berkhout, B. (2004). Viral evolution as a tool to improve the tetracycline-regulated gene expression system. *J Biol Chem* 279, 18776-18782.
- Davis, R.L., and Turner, D.L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.
- Dawson, S.R., Turner, D.L., Weintraub, H., and Parkhurst, S.M. (1995). Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15, 6923-6931.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- de Wynter, E.A., Buck, D., Hart, C., Heywood, R., Coutinho, L.H., Clayton, A., Rafferty, J.A., Burt, D., Guenechea, G., Bueren, J.A., *et al.* (1998). CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16, 387-396.
- Dho, S.E., French, M.B., Woods, S.A., and McGlade, C.J. (1999). Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* 274, 33097-33104.
- Dick, J.E. (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 27, 44-46.

- Dick, J.E., Bhatia, M., Gan, O., Kapp, U., and Wang, J.C. (1997). Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 15 Suppl 1, 199-203; discussion 204-197.
- Dowlati, A. Hunting and trapping the vascular endothelial growth factor. *J Clin Oncol* 28, 185-187.
- Erenpreisa, J., Kalejs, M., and Cragg, M.S. (2005). Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol Int* 29, 1012-1018.
- Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611.
- Fischer, A., Leimeister, C., Winkler, C., Schumacher, N., Klamt, B., Elmasri, H., Steidl, C., Maier, M., Knobloch, K.P., Amann, K., *et al.* (2002). Hey bHLH factors in cardiovascular development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 63-70.
- Flamme, I., Breier, G., and Risau, W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol* 169, 699-712.
- Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K.A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 16, 1397-1411.
- Furman, D.P., and Bukharina, T.A. (2011). Drosophila mechanoreceptors as a model for studying asymmetric cell division. *Int J Dev Biol* 55, 133-141.
- Furukawa, Y. (1997). Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. *Hum Cell* 10, 159-164.
- Gallahan, D., and Callahan, R. (1997). The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14, 1883-1890.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., *et al.* (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161, 1163-1177.
- Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., and Betsholtz, C. (2004). Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn* 231, 503-509.
- Giebel, B. (1999). The notch signaling pathway is required to specify muscle progenitor cells in Drosophila. *Mech Dev* 86, 137-145.
- Giebel, B., and Campos-Ortega, J.A. (1997). Functional dissection of the Drosophila enhancer of split protein, a suppressor of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6250-6254.
- Giebel, B., and Punzel, M. (2008). Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biol Chem* 389, 813-824.
- Giebel, B.W., A (2012). Notch Signaling: Numb Makes the Difference. *Current Biology* 22, 133-135.
- Gimbrone, M.A., Jr., Cotran, R.S., and Folkman, J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60, 673-684.
- Going, J.J., Stuart, R.C., Downie, M., Fletcher-Monaghan, A.J., and Keith, W.N. (2002). 'Senescence-associated' beta-galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J Pathol* 196, 394-400.
- Gordon, W.R., Arnett, K.L., and Blacklow, S.C. (2008). The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* 121, 3109-3119.
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14, 295-300.
- Gospodarowicz, D., Delgado, D., and Vlodavsky, I. (1980). Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4094-4098.
- Goula, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B., and Demeneix, B.A. (1998). Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 5, 712-717.

- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., and Keshet, E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175-189.
- Guo, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27-41.
- Hannah, M.J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L.J., and Cutler, D.F. (2002). Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol* 13, 313-324.
- Hardy, T.A., Garsia, R.J., Halmagyi, G.M., Lewis, S.J., Harrisberg, B., Fulham, M.J., and Barnett, M.H. Tumour necrosis factor (TNF) inhibitor therapy in Susac's syndrome. *J Neurol Sci* 302, 126-128.
- Harris, J., and Keane, J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol* 161, 1-9.
- Hartenstein, V., and Posakony, J.W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.
- Havekes, L., Mommaas-Kienhuis, A.M., Schouten, D., De Wit, E., Scheffer, M., and Van Hinsbergh, V.W. (1985). High-affinity uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by confluent human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 56, 81-92.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* 72, 6307-6314.
- Hellstrom, M., Phng, L.K., and Gerhardt, H. (2007a). VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* 1, 133-136.
- Hellstrom, M., Phng, L.K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.K., Karlsson, L., Gaiano, N., *et al.* (2007b). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445, 776-780.
- Henderson, A.M., Wang, S.J., Taylor, A.C., Aitkenhead, M., and Hughes, C.C. (2001). The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 276, 6169-6176.
- Henninger, D.D., Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D.C., and Granger, D.N. (1997). Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158, 1825-1832.
- Herbert, S.P., and Stainier, D.Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 551-564.
- Hewitt, H.B. (1958). Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice. *Br J Cancer* 12, 378-401.
- Hinz, U., Giebel, B., and Campos-Ortega, J.A. (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77-87.
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A., and Yoder, M.C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1584-1595.
- Hofmann, J.J., and Iruela-Arispe, M.L. (2007). Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res* 100, 1556-1568.
- Hofmann, N.A., Reinisch, A., and Strunk, D. (2009). Isolation and large scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells. *J Vis Exp*.

- Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., *et al.* (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11393-11398.
- Holthofer, H., Virtanen, I., Kariniemi, A.L., Hormia, M., Linder, E., and Miettinen, A. (1982). Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 47, 60-66.
- Horgan, M.J., Ge, M., Gu, J., Rothlein, R., and Malik, A.B. (1991). Role of ICAM-1 in neutrophil-mediated lung vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 261, H1578-1584.
- Hormia, M., Lehto, V.P., and Virtanen, I. (1983). Identification of UEA I-binding surface glycoproteins of cultured human endothelial cells. *Cell Biol Int Rep* 7, 467-475.
- Huang, S., and Terstappen, L.W. (1994). Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* 83, 1515-1526.
- Hume, D.A., Ross, I.L., Himes, S.R., Sasmono, R.T., Wells, C.A., and Ravasi, T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 72, 621-627.
- Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., and Yoder, M.C. (2005). Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 105, 2783-2786.
- Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., and Yoder, M.C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752-2760.
- Iso, T., Sartorelli, V., Chung, G., Shichinohe, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2001a). HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol Cell Biol* 21, 6071-6079.
- Iso, T., Sartorelli, V., Poizat, C., Iezzi, S., Wu, H.Y., Chung, G., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2001b). HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol* 21, 6080-6089.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.
- Jeffries, S., Robbins, D.J., and Capobianco, A.J. (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* 22, 3927-3941.
- Jones, D.L., and Rando, T.A. (2011). Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol* 13, 506-512.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W.M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J.M., and Asahara, T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427.
- Kameda, H., Morita, I., Handa, M., Kaburaki, J., Yoshida, T., Mimori, T., Murota, S., and Ikeda, Y. (1997). Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin. *Br J Haematol* 97, 348-355.
- Karanu, F.N., Murdoch, B., Miyabayashi, T., Ohno, M., Koremoto, M., Gallacher, L., Wu, D., Itoh, A., Sakano, S., and Bhatia, M. (2001). Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* 97, 1960-1967.
- Karanu, F.N., Yuefei, L., Gallacher, L., Sakano, S., and Bhatia, M. (2003). Differential response of primitive human CD34- and CD34+ hematopoietic cells to the Notch ligand Jagged-1. *Leukemia* 17, 1366-1374.
- Karsunky, H., Inlay, M.A., Serwold, T., Bhattacharya, D., and Weissman, I.L. (2008). Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111, 5562-5570.
- Katz, F.E., Tindle, R., Sutherland, D.R., and Greaves, M.F. (1985). Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 9, 191-198.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.

- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K., and Martin, G.R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.
- Klingmuller, D., and Allera, A. (2011). [Endocrine disruptors: hormone-active chemicals from the environment: a risk to humans?]. *Dtsch Med Wochenschr* 136, 967-972.
- Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597.
- Koch, H.M., Preuss, R., and Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* 29, 155-165; discussion 181-155.
- Kokubo, H., Lun, Y., and Johnson, R.L. (1999). Identification and expression of a novel family of bHLH cDNAs related to *Drosophila* hairy and enhancer of split. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 459-465.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.
- Kovall, R.A. (2008). More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* 27, 5099-5109.
- Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66, 188-193.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3613-3622.
- Lai, E.C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 46, 123-136.
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187-195.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B., and Gessler, M. (1999). Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 85, 173-177.
- Leong, K.G., Hu, X., Li, L., Nosedá, M., Larrivee, B., Hull, C., Hood, L., Wong, F., and Karsan, A. (2002). Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 22, 2830-2841.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K.E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D.A., *et al.* (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-519.
- Levenberg, S., Rouwkema, J., Macdonald, M., Garfein, E.S., Kohane, D.S., Darland, D.C., Marini, R., van Blitterswijk, C.A., Mulligan, R.C., D'Amore, P.A., *et al.* (2005). Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23, 879-884.

- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030-1037.
- Li, L., and Bhatia, R. (2011). Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* 17, 4936-4941.
- Li, S.C., Songyang, Z., Vincent, S.J., Zwahlen, C., Wiley, S., Cantley, L., Kay, L.E., Forman-Kay, J., and Pawson, T. (1997). High-affinity binding of the Drosophila Numb phosphotyrosine-binding domain to peptides containing a Gly-Pro-(p)Tyr motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7204-7209.
- Li, S.C., Zwahlen, C., Vincent, S.J., McGlade, C.J., Kay, L.E., Pawson, T., and Forman-Kay, J.D. (1998). Structure of a Numb PTB domain-peptide complex suggests a basis for diverse binding specificity. *Nat Struct Biol* 5, 1075-1083.
- Lin, S.E., Oyama, T., Nagase, T., Harigaya, K., and Kitagawa, M. (2002). Identification of new human mastermind proteins defines a family that consists of positive regulators for notch signaling. *J Biol Chem* 277, 50612-50620.
- Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80, 909-917.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* 8, 284-289.
- Liu, L., Lanner, F., Lendahl, U., and Das, D. (2011). Numblike and Numb differentially affect p53 and Sonic Hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 426-431.
- Li, Z. (2001). Hematopoiesis: A Developmental Approach. Oxford University Press.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.
- Long, M.W. (1995). Cyclins and cell division kinases in megakaryocytic endomitosis. *C R Acad Sci III* 318, 649-654.
- Luo, B., Aster, J.C., Hasserjian, R.P., Kuo, F., and Sklar, J. (1997). Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol* 17, 6057-6067.
- Maciag, T., Kadish, J., Wilkins, L., Stemerman, M.B., and Weinstein, R. (1982). Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* 94, 511-520.
- Madri, J.A., and Stenn, K.S. (1982). Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 106, 180-186.
- Mafi, R., Hindocha, S., Mafi, P., Griffin, M., and Khan, W.S. (2011). Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 5 Suppl 2, 242-248.
- Maillard, I., Weng, A.P., Carpenter, A.C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Xu, L., Allman, D., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2004). Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* 104, 1696-1702.
- Makino, S. (1956). Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats. *Ann N Y Acad Sci* 63, 818-830.
- Marshall, I. (1984). Characterization and distribution of histamine H1- and H2-receptors in precapillary vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 4, S587-597.
- McGill, M.A., Dho, S.E., Weinmaster, G., and McGlade, C.J. (2009). Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem* 284, 26427-26438.
- McGill, M.A., and McGlade, C.J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278, 23196-23203.
- McNiece, I.K., Stewart, F.M., Deacon, D.M., Temeles, D.S., Zsebo, K.M., Clark, S.C., and Quesenberry, P.J. (1989). Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 74, 609-612.
- Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.

- Michaux, G., and Cutler, D.F. (2004). How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Traffic* 5, 69-78.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., and Buck, D.W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021.
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol* 72, 8873-8883.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673.
- Muro, S., and Muzykantov, V.R. (2005). Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. *Curr Pharm Des* 11, 2383-2401.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., *et al.* (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nagano, M., Yamashita, T., Hamada, H., Ohneda, K., Kimura, K., Nakagawa, T., Shibuya, M., Yoshikawa, H., and Ohneda, O. (2007a). Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood* 110, 151-160.
- Nagano, M., Yamashita, T., Hamada, H., Ohneda, K., Kimura, K.I., Nakagawa, T., Shibuya, M., Yoshikawa, H., and Ohneda, O. (2007b). Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood*.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70, 5701-5705.
- Neuss, S., Schneider, R.K., Tietze, L., Knuchel, R., and Jahnke-Dechent, W. (2010). Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs* 191, 36-46.
- Paddison, P.J., Cleary, M., Silva, J.M., Chang, K., Sheth, N., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2004). Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat Methods* 1, 163-167.
- Petersen, P.H., Zou, K., Hwang, J.K., Jan, Y.N., and Zhong, W. (2002). Progenitor cell maintenance requires numb and numblake during mouse neurogenesis. *Nature* 419, 929-934.
- Phng, L.K., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16, 196-208.
- Pichon, B., Taelman, V., Bellefroid, E.J., and Christophe, D. (2004). Transcriptional repression by the bHLH-Orange factor XHRT1 does not involve the C-terminal YRPW motif. *Biochim Biophys Acta* 1680, 46-52.
- Pierce, G.B., and Speers, W.C. (1988). Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res* 48, 1996-2004.
- Pocar, P., Fiandanese, N., Secchi, C., Berrini, A., Fischer, B., Schmidt, J.S., Schaedlich, K., and Borromeo, V. (2011). Exposure to Di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in Utero and during Lactation Causes Long-Term Pituitary-Gonadal Axis Disruption in Male and Female Mouse Offspring. *Endocrinology*.
- Ponce, M.L. (2009). Tube formation: an in vitro matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol Biol* 467, 183-188.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873-887.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.

- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., *et al.* (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308.
- Punzel, M., Liu, D., Zhang, T., Eckstein, V., Miesala, K., and Ho, A.D. (2003). The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp Hematol* 31, 339-347.
- Radsak, K., Fuhrmann, R., Franke, R.P., Schneider, D., Kollert, A., Brucher, K.H., and Drenckhahn, D. (1989). Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch Virol* 107, 151-158.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.
- Rafii, S., and Lyden, D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9, 702-712.
- Rahman, M.M., and McFadden, G. (2006). Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* 2, e4.
- Ranganathan, P., Weaver, K.L., and Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11, 338-351.
- Rebay, I., Fehon, R.G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74, 319-329.
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699.
- Reinisch, A., Hofmann, N.A., Obenauf, A.C., Kashofer, K., Rohde, E., Schallmoser, K., Flicker, K., Lanzer, G., Linkesch, W., Speicher, M.R., *et al.* (2009). Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* 113, 6716-6725.
- Remy, M., Valli, N., Brethes, D., Labrugere, C., Porte-Durrieu, M.C., Dobrova, N.B., Novikova, S.P., Gorodkov, A.J., and Bordenave, L. (1999). In vitro and in situ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by endothelial cells lining a polyester fabric. *Biomaterials* 20, 241-251.
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.
- Rivest, S., Lacroix, S., Vallieres, L., Nadeau, S., Zhang, J., and Laflamme, N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223, 22-38.
- Rotin, D., Staub, O., and Haguenaer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176, 1-17.
- Rouwkema, J., Westerweel, P.E., de Boer, J., Verhaar, M.C., and van Blitterswijk, C.A. (2009). The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15, 2015-2027.
- Ruiz-Torres, M.P., Perez-Rivero, G., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D., and Diez-Marques, M.L. (2006). The leukocyte-endothelial cell interactions are modulated by extracellular matrix proteins. *Cell Physiol Biochem* 17, 221-232.
- Sadeghi, M.M., Schechner, J.S., Krassilnikova, S., Gharaei, A.A., Zhang, J., Kirkiles-Smith, N., Sinusas, A.J., Zaret, B.L., and Bender, J.R. (2004). Vascular cell adhesion molecule-1-targeted detection of endothelial activation in human microvasculature. *Transplant Proc* 36, 1585-1591.
- Sadler, J.E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67, 395-424.

- Sainson, R.C., Aoto, J., Nakatsu, M.N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., and Hughes, C.C. (2005). Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *FASEB J* 19, 1027-1029.
- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol* 14, 2228-2236.
- Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Yokoi, K., Murase, K., Sugiyama, I., Ozawa, M., *et al.* Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol Biol Cell* 22, 3103-3119.
- Schaffner, A. (2006). [Fever--useful or noxious symptom that should be treated?]. *Ther Umsch* 63, 185-188.
- Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-349.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Schreiber, R.D., and Farrar, M.A. (1993). The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn* 28 Suppl 4, 88-94; discussion 95-86.
- Serwold, T., Ehrlich, L.I., and Weissman, I.L. (2009). Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* 113, 807-815.
- Shepherd, B.R., Enis, D.R., Wang, F., Suarez, Y., Pober, J.S., and Schechner, J.S. (2006). Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *FASEB J* 20, 1739-1741.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y., and Hakoshima, T. (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *EMBO J* 16, 4689-4697.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.
- Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., and Ng, M.K. (2008). Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol* 51, 660-668.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., *et al.* (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 37, 1281-1288.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Smith, C.A., Dho, S.E., Donaldson, J., Tepass, U., and McGlade, C.J. (2004). The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling. *Mol Biol Cell* 15, 3698-3708.
- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.
- Steurer, M., Kern, J., Zitt, M., Amberger, A., Bauer, M., Gastl, G., Untergasser, G., and Gunsilius, E. (2008). Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Res Notes* 1, 71.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5, 1416-1423.

- Tanaka, J., Sadanari, H., Sato, H., and Fukuda, S. (1991). Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line. *Virology* 185, 271-280.
- Taylor, K.L., Henderson, A.M., and Hughes, C.C. (2002). Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 64, 372-383.
- Tremblay, P.L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F.A. (2005). Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5, 1002-1010.
- Trindade, A., Kumar, S.R., Scehnet, J.S., Lopes-da-Costa, L., Becker, J., Jiang, W., Liu, R., Gill, P.S., and Duarte, A. (2008). Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood* 112, 1720-1729.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1989). numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 58, 349-360.
- Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J. (1996). Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122, 2251-2259.
- Valentijn, K.M., Sadler, J.E., Valentijn, J.A., Voorberg, J., and Eikenboom, J. (2011). Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 117, 5033-5043.
- van Mourik, J.A., Romani de Wit, T., and Voorberg, J. (2002). Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* 117, 113-122.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7.
- Verdi, J.M., Bashirullah, A., Goldhawk, D.E., Kubu, C.J., Jamali, M., Meakin, S.O., and Lipshitz, H.D. (1999). Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10472-10476.
- Verdi, J.M., Schmandt, R., Bashirullah, A., Jacob, S., Salvino, R., Craig, C.G., Program, A.E., Lipshitz, H.D., and McGlade, C.J. (1996). Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate. *Curr Biol* 6, 1134-1145.
- Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., and Zetter, B.R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040.
- Wang, J., Geiger, H., and Rudolph, K.L. (2011). Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol* 23, 532-536.
- Weber, J.M., and Calvi, L.M. (2010). Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone* 46, 281-285.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-581.
- Wilkin, M.B., Carbery, A.M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S.L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D.A., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol* 14, 2237-2244.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26, 484-489.

- Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J., *et al.* (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* **464**, 1052-1057.
- Xie, L., Li, S., Dong, X., and Yuan, F. (1998). [A preliminary observation on nuclear changes of human corneal endothelial cells in different kinds of corneal diseases]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* **34**, 19-20, 11.
- Yee, J.K., Friedmann, T., and Burns, J.C. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* **43 Pt A**, 99-112.
- Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., Krier, T.R., Mroueh, K.N., Li, F., Krasich, R., Temm, C.J., Prchal, J.T., and Ingram, D.A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801-1809.
- Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N., and Ergun, S. (2006). Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543-1551.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841.
- Zhang, M., Thurmond, R.L., and Dunford, P.J. (2007). The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Ther* **113**, 594-606.
- Zhang, M., Venable, J.D., and Thurmond, R.L. (2006). The histamine H4 receptor in autoimmune disease. *Expert Opin Investig Drugs* **15**, 1443-1452.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.Y., Yu, J., and Guan, K.L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev* **26**, 54-68.
- Zhao, J.J., Liu, Y., Chen, X.L., Liu, J.X., Tian, Y.F., Zhang, P.B., Kang, Q.Y., Qiu, F., and Yang, P.B. (2006). [Effect of histamine on intracortical blood vessels of rats]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **26**, 1284-1287.
- Zwahlen, C., Li, S.C., Kay, L.E., Pawson, T., and Forman-Kay, J.D. (2000). Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* **19**, 1505-1515.
- Zweifel, M.E., and Barrick, D. (2001). Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry* **40**, 14344-14356.